

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

THAINARA CHRISTIE FERREIRA SILVA

**PADRÃO DE METILAÇÃO DO GENE XIST E DA ICR/H19 EM OVÓCITOS
IMATUROS E MATURADOS *IN VITRO* DE PORCAS CÍCLICAS E MARRÃS PRÉ-
PÚBERES**

Orientador: Prof. Dr. Maurício Machaim Franco

Uberlândia - MG

2018

THAINARA CHRISTIE FERREIRA SILVA

**PADRÃO DE METILAÇÃO DO GENE XIST E DA ICR/H19 EM OVÓCITOS
IMATUROS E MATURADOS *IN VITRO* DE PORCAS CÍCLICAS E MARRÃS PRÉ-
PÚBERES**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, como parte dos requisitos necessários à obtenção do grau de mestre em ciências veterinárias.

Linha de pesquisa

Biotécnicas e Eficiência Reprodutiva

Orientador

Prof. Dr. Maurício Machaim Franco –
EMBRAPA Recursos Genéticos e
Biotecnologia

Uberlândia - MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

S586p
2018 Silva, Thainara Christie Ferreira, 1991
 Padrão de metilação do gene XIST e da ICR/H19 em ovócitos
 imaturos e maturados *in vitro* de porcas cíclicas e marrãs pré-púberes /
 Thainara Christie Ferreira Silva. - 2018.
 50 f. : il.

 Orientador: Maurício Machaim Franco.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
 Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.756>
 Inclui bibliografia.

 1. Veterinária - Teses. 2. Suíno - Reprodução - Teses. 3. Fertilização
 in vitro - Teses. I. Franco, Maurício Machaim. II. Universidade Federal
 de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias.
 III. Título.

CDU: 619

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS



Ata da defesa de Dissertação de MESTRADO ACADÊMICO junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Defesa de: Dissertação de mestrado acadêmico nº PPGCV/008/2018

Data: 27/04/2018

Discente: *Thainara Christie Ferreira Silva* – Matrícula – 11612MEV022

Título da Dissertação: **PADRÃO DE METILAÇÃO DOS GENES XIST E IGF2 EM OVÓCITOS IMATUROS E MATURADOS *in vitro* DE PORCAS CÍCLICAS E MARRÃS PRÉ-PÚBERES**

Área de concentração: PRODUÇÃO ANIMAL

Linha de pesquisa: BIOTÉCNICAS E EFICIÊNCIA REPRODUTIVA

Projeto de Pesquisa de vinculação: CONTROLE EPIGENÉTICO DA GAMETOGENESE E EMBRIOGENESE INICIAL

No dia 27 de abril do ano de 2018 às 08:00 horas na sala 2D54 – Bloco 2D - Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia, reuniu-se a Comissão Julgadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, composta pelos Professores(as)/Doutores(as): **Robson Carlos Antunes** – UNIVERSIDADE DE UBERLÂNDIA; **Thiago Felipe Braga** – INSTITUTO MASTER DE ENSINO - IMEPAC e **Maurício Machaim Franco** orientador(a) do(a) candidato(a).

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da comissão Dr./Dra. Maurício Machaim Franco concedeu a palavra ao(a) candidato(a) para uma exposição do seu trabalho, contando com o tempo máximo de 50 minutos. A seguir o(a) senhor(a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o(a) candidato(a), durante o prazo máximo de (30) minutos, assegurando-se ao mesmo igual prazo para resposta. Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Comissão Julgadora, em sessão secreta, considerou o(a) candidato(a) APROVADA.

Esta defesa de dissertação de mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme Regulamento do Programa, Legislação e a Regulamentação Interna da UFU.

Nada mais havendo a tratar o(a) Presidente encerrou os trabalhos às 11 horas e 34 minutos, lavrou esta ata que será assinada por todos os membros da Comissão Examinadora. Uberlândia, 27 de Abril de 2018.

Robson Carlos Antunes

Prof. Dr. Robson Carlos Antunes

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Thiago Felipe Braga

Prof. Dr. Thiago Felipe Braga

INSTITUTO MASTER DE ENSINO - IMEPAC

Maurício Machaim Franco

Prof. Dr. Maurício Machaim Franco

ORIENTADOR

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

Rua Ceará, s/nº Bloco 2D – Sala 03 - Campus Umuarama - 38400-902 - Uberlândia – MG

Fone: +55 – 34 – 3218-2494

E-mail: mesvet@ufu.br

Endereço Eletrônico: <http://www.mestrado.famev.ufu.br>

A todos aqueles que contribuíram
para a realização desse trabalho,
em especial, meus pais Vicente e Zilma,
que são toda minha fonte de inspiração,
ao meu irmão Phillipe e ao meu noivo
Guilherme, que sempre torceram por mim.
A vocês dedico essa dissertação.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo amparo, pela saúde e por toda força necessária para que eu pudesse chegar até aqui. Agradeço Seu amor de Pai que me fez mais forte para alcançar meus objetivos.

Aos meus pais, Vicente e Zilma, que me apoiaram incessantemente, me guiaram e me proporcionaram as condições necessárias para todas as minhas conquistas. Obrigada por serem tão amorosos e dedicados. Agradeço ao meu irmão Phillipe, por sempre acreditar em mim, me dando força e apoio nos momentos difíceis e tornando meus dias melhores.

Ao meu orientador, Maurício, por confiar em mim, por me guiar sempre e por tornar possível essa conquista. Obrigada por todos os ensinamentos, por todos os conselhos e pela sua amizade.

Ao meu noivo, Guilherme, por compreender a distância e principalmente por me apoiar e tornar mais fácil todos os dias em que fiquei longe. Agradeço pelo incentivo de sempre, por seu amor e principalmente pelo exemplo que é para mim.

Aos amigos e componentes da banca Professor Robson e Thiago, por aceitarem o convite para participar e contribuir com a construção deste trabalho. Agradeço ao Robson por todos os ensinamentos ao longo de vários anos durante a graduação. Agradeço também ao Thiago pela coleta do material e por todo o ensinamento e dedicação durante o período em que estive no estágio.

Aos amigos que fiz durante essa jornada, Anelise, Márcia, Naiara, Luna, Isaura, Taynan, Natália e todos aqueles do nosso laboratório, por todas as conversas nas horas boas e nas horas difíceis, por compartilharem a saudade de casa, por me ajudarem sempre que precisei. A amizade é uma bênção e vou levar sempre vocês em meu coração.

A todos os funcionários da Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, pesquisadores, técnicos, funcionários da limpeza. Agradeço em especial ao

Regivaldo, a Dra Margot, Dr Eduardo, Dr Ricardo e Dr Alexandre por todos os conselhos e apoio técnico.

À Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia por fornecer toda a estrutura para a realização desse trabalho.

À Universidade Federal de Uberlândia e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias pelo programa de mestrado oferecido. Agradeço aos funcionários que estavam sempre prontos a ajudar, em especial a Célia e a Ricarda.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos oferecida.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
RESUMO.....	xv
ABSTRACT.....	xvi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
2.1 Fisiologia Reprodutiva da Fêmea Suína.....	2
2.2 Foliculogênese e Ovogênese.....	3
2.3 Aquisição da competência ovocitária.....	5
2.4 Maturação ovocitária.....	6
2.5 Produção <i>in vitro</i> de embriões (PIVE) suínos.....	8
2.6 Epigenética.....	9
2.6.1 Metilação do DNA.....	10
2.6.2 Modificações de histonas.....	12
2.6.3 Reprogramação epigenética.....	13
2.6.4 <i>Imprinting</i> genômico.....	15
2.7 Genes IGF2 e H19.....	17
2.8 O gene XIST e a inativação do cromossomo X.....	19
3 OBJETIVOS.....	21
3.1 Geral.....	21
3.2 Específico.....	21
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	21
4.1 Recuperação e seleção dos ovócitos.....	21
4.2 Maturação <i>in vitro</i>	22
4.3 Extração do DNA genômico.....	23
4.3.1 Extração de DNA de ovócitos.....	23

4.3.2 Extração de DNA de espermatozoide.....	23
4.4 Tratamento com bissulfito de sódio.....	24
4.5 Amplificação do DNA.....	24
4.6 Clonagem dos produtos da PCR e extração do DNA plasmidial.....	26
4.7 Sequenciamento do DNA plasmidial e análise das sequências.....	27
4.8 Análises estatísticas.....	28
5 RESULTADOS.....	28
6 DISCUSSÃO.....	34
7 CONCLUSÕES.....	38
REFERÊNCIAS.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CCs – Células do cumulus
CH₃ – Grupo metil
CIV – Cultivo *in vitro*
CL – Corpo Lúteo
CGPs – Células germinativas primordiais
COC – Complexo cumulus-ovócito
CpG – Citosina-fosfato-Guanina
CTCF – Fator ligante CCCTC
DMR – Região diferencialmente metilada
DNA – Ácido desoxirribonucléico
DNMT – DNA Metiltransferase
dNTP – Desoxirribonucleotídeos fosfatados
D6 – Dia 6
EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético
FIV – Fecundação *in vitro*
FSH – Hormônio Folículo Estimulante
gDMR – Região diferencialmente metilada germinativa
GH – Hormônio do Crescimento
GV – Vesícula germinativa
GVBD – Quebra da vesícula germinativa
HAT – Histona Acetiltransferase
HBT - *Hepes buffered Tyrode's*
HDAC – Histona Deacetilase
HDMT – Histona Desmetilase
HMT – Histona Metiltransferase

H3K4me – Metilação da lisina 4 da histona 3

H3K9me2 – Dimetilação da lisina 9 da histona 3

H3K27me3 – Trimetilação da lisina 27 da histona 3

ICR – Região controladora de *imprinting*

ICR/H19 – Região controladora de *imprinting* dos genes IGF2 e H19

ICX – Inativação do cromossomo X

IGF2 – Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2

IGF2R – Receptor do Fator de crescimento semelhante a insulina tipo 2

IPTG – Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo

LB – Meio Luria-Bertani

LH – Hormônio Luteinizante

M – Molar

mA – Miliampere

MAPK – Proteína quinase ativada por mitógeno

MCI – Massa celular interna

MIV – Maturação *in vitro*

MSCI – Inativação dos Cromossomos Sexuais Meióticos

mg – Miligrama

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

mGV – Ovócitos imaturos de marrãs pré-púberes

MI – Metáfase I

MII – Metáfase II

min – Minutos

mL – Mililitro

mm – Milímetro

mM – Milimolar

mMII – Ovócitos maturados *in vitro* de marrãs pré-púberes

MPF – Fator Promotor da Maturação

mRNA – RNA mensageiro

N – Normal

NaCl – Cloreto de sódio

NaOH – Hidróxido de sódio

OCT4 – Fator de transcrição ligante no octâmero 4

pb – Pares de base

PBS – Solução salina em tampão fosfato

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pGV – Ovócitos imaturos de porcas cíclicas

pH – Potencial hidrogeniônico

PIVE – Produção *in vitro* de embriões

pMII – Ovócitos maturados *in vitro* de porcas cíclicas

Pmol – Picomol

PRC2 – Complexo Repressivo Policomb tipo 2

RNA – Ácido ribonucleico

RNAse – Ribonuclease

Rnf12 – Proteína *Ring Finger*

rpm – Rotação por minuto

s – Segundo

SAM – S-Adenosilmetionina

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SPTZ - Espermatozóide

TBE – Tampão Tris-Borato-EDTA

TCM-199 – Meio de Cultura de Tecidos-199

TDG – Thymine DNA glycosylase

TET – *Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase*

TRA – Técnica de Reprodução Assistida

U – Unidades

UI – Unidades Internacionais

X-GAL – 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosídeo

Xi – Cromossomo X inativo

XIC – Centro de inativação do cromossomo X

XIST – Transcrito específico do cromossomo X inativo

Xm – Cromossomo X materno

Xp – Cromossomo X paterno

YY1 – Transcrito Ying Yang 1

°C – Graus Celsius

μ g – Micrograma

μ L – Microlitro

μ M – Micromolar

ng – Nanograma

μ m – Micrômetro

5hmC – 5-hidroximetilcitosina

5mC – 5-metilcitosina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Esquema de reprogramação da metilação do DNA durante a gametogênese e embriogênese inicial utilizando basicamente o modelo descrito em camundongo.....	14
Figura 2: Estrutura do <i>locus</i> IGF2/H19 de camundongo mostrando a localização da ICR/H19 e dos genes IGF2 e H19.....	18
Figura 3: Esquema representando a regulação da expressão <i>imprinted</i> dos genes IGF2 e H19 em camundongos.....	19
Figura 4: Localização da DMR1 da ICR/H19 de suínos.....	24
Figura 5: Padrão de metilação da ICR/H19 de ovócitos imaturos e maturados <i>in vitro</i> de marrãs pré-púberes e porcas cíclicas e espermatozoides de suínos, determinado por tratamento com bissulfito de sódio.....	29
Figura 6: A figura mostra a comparação do padrão de metilação para a ICR/H19 entre ovócitos imaturos e maturados <i>in vitro</i> de marrãs pré-púberes e porcas cíclicas.....	30
Figura 7: A figura mostra a comparação do padrão de metilação da ICR/H19 entre ovócitos maturados <i>in vitro</i> de marrã pré-pubere e espermatozoides (esquerda) e entre ovócitos maturados <i>in vitro</i> de porca cíclica e espermatozoides (direita).....	30
Figura 8: Padrão de metilação do gene XIST de ovócitos imaturos e maturados <i>in vitro</i> de marrãs pré-púberes, porcas cíclicas e espermatozoides de suínos, determinado por tratamento com bissulfito de sódio.....	31
Figura 9: A figura mostra a comparação do padrão de metilação para o gene XIST entre ovócitos imaturos e maturados <i>in vitro</i> de marrãs pré-púberes e porcas cíclicas.....	32
Figura 10: A figura mostra a comparação do padrão de metilação do gene XIST entre ovócitos maturados <i>in vitro</i> de marrã pré-pubere e espermatozoides (esquerda) e entre ovócitos maturados <i>in vitro</i> de porca cíclica e espermatozoides (direita).....	33
Figura 11: A figura mostra os resultados do padrão de metilação em formato de círculos e de barras para as duas regiões (ICR/H19 e XIST).....	33

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Identificação do Gene, sequências dos <i>primers</i> , código de acesso ao <i>GenBank</i> , localização dos <i>primers</i> , posição da ilha CpG e tamanho do fragmento amplificado.....	25
Tabela 2. Condições de amplificação utilizada nas <i>nested</i> PCR para o gene XIST e para a ICR/H19.....	26
Tabela 3: Porcentagem de metilação, número de sequências analisadas, número mínimo de alelos e número de sequências hipermetiladas encontrados para cada grupo, para o gene XIST e para a ICR/H19.....	34

PADRÃO DE METILAÇÃO DO GENE XIST E DA ICR/H19 EM OVÓCITOS IMATUROS E MATURADOS *IN VITRO* DE PORCAS CÍCLICAS E MARRÃS PRÉ-PÚBERES

RESUMO

A idade reprodutiva da fêmea é um dos fatores que afeta a produção *in vitro* de embriões. Sabe-se que ovócitos de fêmeas pré-púberes comparados com fêmeas púberes apresentam menor competência de desenvolvimento. Portanto, é importante compreender os aspectos que causam essa menor competência para se alcançar uma melhor eficiência da PIVE. Nesta pesquisa comparou-se o padrão de metilação do gene XIST e da ICR/H19 de ovócitos obtidos de marrãs pré-púberes e porcas cíclicas antes e depois da maturação *in vitro*. Para a ICR/H19, não houve diferenças para os níveis de metilação entre os tratamentos avaliados. Os percentuais de metilação foram: mGV ($36,15 \pm 8,6\%$), pGV ($30,14 \pm 7,2\%$), mMII ($17,35 \pm 6,7\%$) e pMII ($19,96 \pm 6,9\%$). Porém, quando comparados ao controle (espermatozoide - $94,3 \pm 1,04\%$), os ovócitos de mMII e pMII foram menos metilados ($p=0,0001$). Esses dados confirmam a característica *imprinted* do gene, com espermatozoide metilado e ovócito MII desmetilado. O gene XIST apresentou padrões de metilação diferentes entre os grupos mGV ($17,29 \pm 5,8\%$) e pGV ($48,81 \pm 9,6\%$) ($p=0,0305$), entre mGV e mMII ($0,28 \pm 0,2\%$) ($p=0,0342$) e entre mMII e pMII ($82,35\%$) ($p=0,0001$). Quando comparado com o padrão de espermatozoide ($0,42 \pm 0,42\%$), os ovócitos de pMII foram estatisticamente diferentes ($p=0,0001$), porém os ovócitos de mMII foram iguais. Esses dados confirmam que essa região do XIST também apresenta uma característica *imprinted*, com espermatozoide desmetilado e ovócitos pMII metilado. Além disso, os resultados mostraram que os ovócitos menos competentes, de marrãs, não conseguiram se reprogramar corretamente para essa região do XIST após a maturação *in vitro*. Assim, sugere-se que essa região tem potencial para ser utilizada como um marcador molecular epigenético para competência ovocitária, já que os ovócitos menos competentes apresentaram um padrão de metilação muito alterado do que aquele esperado para um ovócito maturado.

Palavras-chave: Competência ovocitária. Epigenética. IGF2. *Imprinting*. Maturação ovocitária. Metilação de DNA. Suínos. XIST.

ABSTRACT

The reproductive age of the female is one of the factors that affects the in vitro embryo production. It is known that oocytes from prepubertal females compared to cycling females have lower developmental competence. Therefore, it is important to better understand the aspects causing this lesser competence to achieve better efficiency of the IVP. In this research, the methylation pattern of the XIST gene and the ICR/H19 of oocytes obtained from prepubertal gilts (g) and cycling sows (s) were compared. Regarding the ICR/H19, there were no differences for methylation levels among the groups. The methylation percentages were: gGV ($36.15 \pm 8.6\%$), sGV ($30.14 \pm 7.2\%$), gMII ($17.35 \pm 6.7\%$) and sMII ($19.96 \pm 6.9\%$). However, when compared to the control (spermatozoa - $94.3 \pm 1.04\%$), gMIII and sMII were less methylated ($p=0.0001$). These data confirm the imprinted pattern of the gene, with spermatozoa highly methylated and MII oocytes hypomethylated. The XIST gene showed different methylation patterns when comparing gGV ($17.29 \pm 5.8\%$) and sGV ($48.81 \pm 9.6\%$) groups ($p=0.0305$), gGV and gMII ($0.28 \pm 0.2\%$) ($p=0.0342$) and gMIII and sMII (82.35%) ($p=0.0001$). However, to the spermatozoa ($0.42 \pm 0.42\%$), sMII oocytes comparing were different ($p = 0.0001$). These data confirm that this region of the XIST also exhibits an imprinted pattern, with spermatozoa demethylated and the oocytes highly methylated. In addition, results showed that less competent oocytes, from gilts, were unable to correctly reprogram the methylation pattern of this region of XIST after in vitro maturation. Thus, it is suggested that this region of XIST has potential to be used as an epigenetic molecular marker for oocyte competence, since the less competent oocytes exhibit an altered methylation pattern than that what is expected for a matured competent oocyte.

Keywords: Oocyte competence. Epigenetics. IGF2. Imprinting. Oocyte maturation. Methylation of DNA. Swine. XIST.

1 INTRODUÇÃO

A produção *in vitro* de embriões (PIVE) é uma técnica de reprodução assistida (TRA) que compreende as etapas de maturação, fecundação e cultivo embrionário *in vitro* até os estágios de mórula e blastocisto. Essa técnica permite explorar o máximo potencial reprodutivo das fêmeas e é utilizada para acelerar a multiplicação de animais geneticamente superiores. Os suínos são um excelente modelo biomédico para humanos, devido às semelhanças biológicas que possuem com os mesmos. Portanto, essa biotecnologia também pode ser usada como fonte de células e órgãos para xenotransplantes, animais clones e transgênicos para produzir proteínas específicas (Lunney, 2007).

No entanto, esta técnica ainda tem seu uso limitado devido à falta de padronização dos meios de maturação, fecundação e cultivo, alta incidência de polispermia e baixo potencial de desenvolvimento embrionário quando comparado com os embriões produzidos *in vivo* (Nakamura, Tajima e Kikuchi, 2017). Além desses fatores, a origem dos ovócitos, provenientes de fêmeas pré-púberes ou fêmeas púberes, pode afetar a produção de embriões e o emprego das técnicas de reprodução assistida (Van De Leemput *et al.*, 1999). Ovócitos obtidos de marrãs em comparação com ovócitos de porcas possuem menor competência de desenvolvimento e um número menor atinge a fase de metáfase II durante o processo de maturação (Sherrer, Rathbun e Davis, 2004). Portanto, é importante compreender o que afeta ou determina a qualidade do ovócito, para que se consiga obter um desenvolvimento adequado do embrião.

Avaliando-se ovócitos de marrãs e porcas maturados *in vitro*, alguns genes já foram identificados como possíveis marcadores moleculares para qualidade embrionária (Paczkowski *et al.*, 2011). Além disso, vários trabalhos foram realizados em diferentes espécies para determinar o padrão de metilação de ovócitos a fim de se compreender como a metilação do DNA e a competência ovocitária estão relacionadas (Park *et al.*, 2009; Fagundes *et al.*, 2011; Liang *et al.*, 2014).

Dentro deste panorama, a avaliação do perfil epigenético de genes antes e após a maturação *in vitro* pode fornecer informações importantes na busca por marcadores moleculares relacionados à maturação e competência ovocitária. O uso das biotécnicas de reprodução animal é importante e necessário dentro dos programas de melhoramento e de conservação animal, além dessas técnicas serem

importantes como modelos de estudos, aumentando a eficiência da multiplicação de animais de interesse. A descoberta e o uso de marcadores moleculares relacionados à qualidade ovocitária podem auxiliar no desenvolvimento e adaptação de novos protocolos de PIVE, melhorando a eficiência das TRAs.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Fisiologia Reprodutiva da Fêmea Suína

O ciclo estral de uma fêmea suína dura em média 21 dias, podendo variar de 18 – 24 dias, e ocorre durante o ano todo. Por isso a espécie é considerada poliéstrica não estacional. Há duas fases que caracterizam o ciclo estral de suínos: a fase folicular e a fase luteal. A primeira, com duração de 4 – 5 dias, compreende o período desde a regressão do corpo lúteo (CL) até a ovulação, e a segunda dura de 15 – 17 dias (Frare *et al.*, 2013).

A fase folicular pode ser subdividida em pró-estro (1 – 3 dias) e estro. No pró-estro há liberação de prostaglandina pelo endométrio e com isso ocorre luteólise, levando à queda da progesterona. O estro se inicia com a queda dos níveis circulantes de progesterona, produzido pelo corpo lúteo e aumento dos níveis de estrógeno, produzido pelo folículo (Prather e Day, 1998). Antes da ovulação há a liberação máxima de estrógeno, pois o crescimento folicular está no seu ponto máximo e após a ovulação, com a formação do corpo lúteo, a progesterona é que atinge seu ponto máximo (Soede e Kemp, 1997). Além disso, ocorre o pico de LH que desencadeia uma série de alterações nos folículos ovulatórios levando à maturação dos ovócitos (Soede e Kemp, 1997).

Na fase luteal há predominância de progesterona devido à presença do CL. Essa fase é dividida em metaestro (2 – 3 dias) e diestro (7 – 12 dias). Na primeira, há concentração de estrógeno em níveis basais e produção de progesterona pelos corpos hemorrágicos. Além disso, as células da granulosa e teca sofrem diferenciação e infiltração de vasos e tecido conjuntivo, sendo então denominadas de células luteais grandes e células luteais pequenas, respectivamente (Frare *et al.*, 2013). Caso ocorra a gestação, essas células produzirão progesterona para a manutenção da mesma. No diestro há produção máxima de progesterona entre os dias 12 – 14 do ciclo. Nos dias 15 – 16 inicia-se a regressão do CL, em fêmeas não gestantes, levando a

concentração de progesterona à níveis basais nos dias 17 – 18 do ciclo estral (Frare *et al.*, 2013).

Fêmeas suínas jovens diferem das porcas em alguns aspectos reprodutivos, por exemplo na duração do estro, que em porcas dura em média 50 – 60 horas e em leitoas de 26 a 36 horas (Frare *et al.*, 2013). Além disso, as porcas ovulam em média entre 40 – 50 horas após o início do cio (Soede e Kemp, 1997), já as leitoas após 30 – 38 horas do início do cio (Prather e Day, 1998).

De forma geral, as fêmeas suínas liberam grande número de ovócitos (10 – 30 ovócitos em cada ciclo), e apresentam taxa de fecundação entre 95 e 100%, porém, cerca de 50% dos embriões são perdidos durante a gestação (Serret *et al.*, 2007). Do total de perdas, 30 – 40% ocorrem no terço inicial da gestação e 10% durante a fase fetal (Serret *et al.*, 2007). Esse fato pode ser explicado pela assincronia útero-embrião e o intervalo de tempo que é necessário para que ocorra a ovulação de todos os folículos (Serret *et al.*, 2007). A entrada dos embriões no corpo uterino ocorre em aproximadamente 48 horas após a ovulação, no estágio de 4 células, quando também ocorre a ativação do genoma embrionário (Telford, Watson e Schultz, 1990). Já a eclosão dos embriões ocorre entre os dias 6 (D6) e 7 (D7) (Prather e Day, 1998). Portanto, é uma fase crítica em que se deve ter cuidado com o manejo da fêmea suína (Deschamps *et al.*, 2007).

2.2 Foliculogênese e Ovogênese

Com o crescente avanço das TRAs torna-se necessário cada vez mais uma melhor compreensão dos eventos envolvidos na foliculogênese e ovogênese, a fim de se obter maior eficiência das técnicas que utilizam ovócitos maturados *in vitro* (Adona *et al.*, 2015). A ovogênese refere-se à produção do gameta feminino (ovócito), desde o desenvolvimento e diferenciação das células germinativas primordiais (CGPs) até a formação do ovócito e sua fecundação. Concomitante a esse evento ocorre a formação e desenvolvimento do folículo (foliculogênese), que é a unidade morfofuncional do ovário e desempenha funções de produção de hormônios esteróides e mantém a viabilidade do ovócito até o momento da ovulação (Adona *et al.*, 2015).

Durante a embriogênese inicial em mamíferos, as CGPs, que se encontram em uma região extra-embionária próxima ao saco vitelínico migram para o epitélio endodermal do intestino posterior e depois se movem pelo mesentério dorsal em

direção às cristas urogenitais, onde se formará o ovário e estas células se alojam e se diferenciam em ovogônias. Essa migração ocorre por movimentos amebóides (Soto-Suazo e Zorn, 2005). As CGPs sofrem sucessivas divisões mitóticas e se diferenciam em ovogônias (diploides – $2n$) (Adona *et al.*, 2015). Nesse momento inicia-se a foliculogênese e o processo de divisão meiótica, dando origem aos ovócitos primários. No entanto, a meiose é interrompida na fase de diplóteno da prófase I (Adona *et al.*, 2015). Os ovócitos parados em diplóteno são considerados imaturos e a meiose é retomada apenas após o nascimento, quando o animal atinge a puberdade.

O início da foliculogênese caracteriza-se pela cobertura do ovócito imaturo por uma camada de células da granulosa formando os folículos primordiais. Esses folículos conterão, portanto, todo o estoque de gametas femininos (determinado durante o período fetal) por toda a vida da fêmea mamífera e a cada ciclo vão sendo recrutados para crescimento (Zuccotti *et al.*, 2011). O recrutamento desses folículos dentro da dinâmica folicular é independente de gonadotrofinas, sendo, portanto, influenciados por fatores ovarianos locais e podendo se tornar atrésicos. No entanto, a seleção de folículos ovulatórios é dependente de gonadotrofinas (Frare *et al.*, 2013).

O folículo primário apresenta alterações do formato das células da granulosa de pavimentoso para cúbico e o ovócito aumenta de tamanho (Fair, 2003). O folículo secundário é caracterizado por mais de uma camada de células somáticas e inicia-se o processo de formação da cavidade antral (Fortune *et al.*, 2000). Também nesse estágio forma-se a zona pelúcida ao redor do ovócito (Fair, 2003). A formação do antro leva à separação das células da granulosa das células do cumulus (CCs). As primeiras são responsáveis pela produção de hormônios esteroides e as CCs, que se ligam ao ovócito através das junções *gap*, dão suporte ao desenvolvimento ovocitário (Zuccotti *et al.*, 2011; Macaulay *et al.*, 2014).

No período pré-ovulatório, o ovócito sofre a maturação nuclear, citoplasmática e molecular, o que o torna apto para a fecundação (Fair, 2003; Mehlmann, 2005). Após o pico de LH, o ovócito retoma a meiose, havendo primeiramente o rompimento da vesícula germinativa (VG) e formação da placa metafásica (Fair, 2003; Mehlmann, 2005). Em seguida, o ovócito interrompe novamente a meiose em metáfase II, momento em que ocorre a ovulação (Mehlmann, 2005).

2.3 Aquisição da competência ovocitária

A competência ovocitária é definida como a capacidade de um ovócito formar um embrião. A aquisição dessa competência ocorre, *in vivo*, durante a sua fase de crescimento, ou seja, simultaneamente ao desenvolvimento do folículo. *In vitro*, a maturação espontânea dos ovócitos causa uma assincronia entre a maturação nuclear e citoplasmática levando a uma diminuição da competência (Lee *et al.*, 2015).

A qualidade do ovócito é um fator que afeta a competência. Alguns fatores, como estado nutricional da doadora, armazenamento e transporte após aspiração e os meios utilizados na PIVE, podem afetar a quantidade e qualidade dos gametas femininos (Leroy *et al.*, 2015; Tsoulis *et al.*, 2016; Amoako, Nafee e Ola, 2017; Suttirojpatana *et al.*, 2017). Além disso, o tamanho do folículo (Marchal *et al.*, 2002; Caixeta *et al.*, 2009) e idade da doadora também são fatores importantes para a qualidade e competência ovocitárias. Ovócitos oriundos de fêmeas adultas tiveram melhor capacidade de desenvolvimento em relação aos de porcas jovens (O'Brien *et al.*, 2000; Armstrong, 2001; Marchal *et al.*, 2001; Grupen *et al.*, 2003; Bagg *et al.*, 2007; Paczkowski *et al.*, 2011).

Folículos grandes apresentaram ovócitos com maiores taxas de maturação nuclear *in vitro*, formação pró-nuclear e produção de blastocistos quando comparados com ovócitos de folículos pequenos (Yoon *et al.*, 2000; Marchal *et al.*, 2002). Além disso, em bovinos, foi caracterizado que a expressão dos genes que codificam histonas aumenta gradativamente conforme o tamanho do folículo também aumenta, e isso pode estar relacionado com a competência do ovócito (Caixeta *et al.*, 2009).

O COC (complexo cumulus-ovócito) como um todo também participa da aquisição de competência do ovócito. O ovócito interage com as CCs através das junções *gap*, que são pequenas projeções transzonais que penetram a zona pelúcida e entram em contato com a membrana plasmática do ovócito. Assim, as CCs conseguem dar suporte ao gameta durante seu crescimento e desenvolvimento (Macaulay *et al.*, 2014). A comunicação bidirecional entre ovócito e CCs é fundamental para a aquisição de competência e desenvolvimento dos ovócitos (Gilchrist, Lane e Thompson, 2008; Macaulay *et al.*, 2014).

Durante a formação dos gametas há uma primeira onda de reprogramação epigenética necessária para que essas células fiquem aptas à fecundação (Reik, Dean e Walter, 2001; Morgan *et al.*, 2005; Franco, Marinho e Lunardelli, 2016). O estabelecimento incorreto das marcas epigenéticas durante a formação dos gametas

os tornam incapazes de formar o embrião (Amoako, Nafee e Ola, 2017). Portanto, estudos a respeito da reprogramação epigenética durante a ovogênese podem subsidiar a melhoria da eficiência das TRAs. Além disso, é importante definir se a idade da fêmea influencia no estabelecimento dos padrões epigenéticos durante a ovogênese.

2.4 Maturação ovocitária

A maturação ovocitária é uma das fases mais importantes e críticas da produção de embriões, pois tem um papel determinante na produção e qualidade dos embriões já que é nesse período que o ovócito adquire capacidade para prosseguir com o desenvolvimento (Gottardi e Mingoti, 2009). Os ovócitos coletados são selecionados de acordo com a morfologia, o que nem sempre reflete a qualidade dos mesmos, já que é um método subjetivo, podendo resultar em embriões de pior qualidade (Wang e Sun, 2006). O ovócito passa por processos de maturação nuclear, citoplasmática e molecular, que o torna capaz de suportar o desenvolvimento embrionário (Wang e Sun, 2006; Zuccotti *et al.*, 2011). O primeiro refere-se a uma série de eventos que envolvem a divisão dos cromossomos propriamente dita, desde a fase de diplóteno da prófase I até a fase de metáfase II. Já a maturação citoplasmática e molecular envolvem a redistribuição de organelas e estoque de RNA mensageiro (mRNA) e proteínas respectivamente, sendo isso essencial para o posterior desenvolvimento embrionário (Watson, 2007).

Durante a maturação nuclear, os ovócitos de mamíferos passam por períodos de retenção meiótica em dois momentos. O primeiro é na fase inicial da divisão meiótica (estágio de VG), em que o ovócito fica retido, *in vivo*, até que a retomada da meiose seja desencadeada pelo pico de LH e gonadotrofinas (Zuccotti *et al.*, 2011). Na maturação *in vitro*, a retomada da meiose ocorre espontaneamente logo após a aspiração dos COCs dos folículos (Gilchrist e Thompson, 2007).

Neste evento há a quebra da vesícula germinativa (GVBD), que marca o início da maturação nuclear e, em mamíferos, é caracterizada pela condensação gradual da cromatina, desaparecimento do nucléolo e desintegração da membrana nuclear (Kubelka *et al.*, 1988). Em seguida, as cromátides se organizam em fuso caracterizando o estágio de metáfase I (MI), seguido por anáfase e telófase. Nesse período, os cromossomos homólogos são divididos em duas células (metade dos cromossomos fica no ovócito e a outra metade no primeiro corpúsculo polar),

formando uma célula haplóide. O citoplasma, no entanto, é dividido assimetricamente, sendo o ovócito muito maior que o corpúsculo polar (Can, Semiz e Cinar, 2003). Os ovócitos então alcançam o estágio de metáfase II (MII), que é o segundo período de retenção meiótica. Aqui, os ovócitos estão maturados e aptos para a fecundação, quando então o ovócito retoma novamente a meiose (Lonergan *et al.*, 2000). O término da segunda divisão meiótica se caracteriza pela progressão de MII até telófase II, que culmina na extrusão do segundo corpúsculo polar (Gottardi e Mingoti, 2009).

Na maturação citoplasmática há uma reorganização de estruturas para a periferia do ovócito e na maturação molecular o acúmulo de nutrientes, substratos e mRNA que são necessários para o término da maturação, fecundação e para o futuro desenvolvimento embrionário inicial (Watson, 2007; Gottardi e Mingoti, 2009). Nesse período, é importante que haja uma sincronização entre a maturação nuclear e citoplasmática para que se obtenha uma boa eficiência da PIVE (Lee *et al.*, 2015).

A maturação molecular consiste em várias etapas, como transcrição, armazenamento e processamento do mRNA, que será traduzido em proteínas necessárias para os eventos celulares subsequentes, como a fecundação e a embriogênese inicial (Gottardi e Mingoti, 2009). A maioria dos mRNA acumulados no ovócito é sintetizada durante o período de crescimento ovocitário (De Sousa *et al.*, 1998), pois, após a retomada da meiose, com a condensação dos cromossomos, a síntese de mRNA pelo ovócito reduz (Wu *et al.*, 1996; Mamo *et al.*, 2011; Macaulay *et al.*, 2014; Sprícigo *et al.*, 2014). Assim, até que haja a transição materno-zigótica (ativação do genoma embrionário), o desenvolvimento do ovócito e do embrião precoce depende dos estoques de mRNA e proteínas acumulados anteriormente (De Sousa *et al.*, 1998; De La Fuente e Eppig, 2001). Em suínos, essa transição ocorre no estágio de embrião de 4 células (Telford, Watson e Schultz, 1990).

Os mRNAs estocados no ovócito estão dormentes devido a sua curta cauda poli-A. Quando necessária a sua tradução, o mRNA sofre poliadenilação, ou seja, adição de adeninas na posição 3', reação catalisada pela enzima poli-A polimerase (Gottardi e Mingoti, 2009; Liu *et al.*, 2016). Assim, há a liberação de moléculas repressoras acopladas ao segmento 5' e o mRNA se torna circular, o que permite a sua tradução (Gottardi e Mingoti, 2009). Portanto, a cauda poli-A curta não permite a tradução do RNA. As CCs também podem transferir mRNA para o ovócito (Macaulay *et al.*, 2014). Através das junções *gap*, essas células transferem nutrientes necessários para o crescimento e para aquisição de competência do ovócito

(Macaulay *et al.*, 2014). Dentre os transcritos produzidos durante a maturação, os principais são reguladores do ciclo celular, como por exemplo o MPF (fator promotor de maturação) (Sprícigo *et al.*, 2014) e a MAPK (proteína quinase ativada por mitógenos) (Ferreira *et al.*, 2009; Adona *et al.*, 2015). As alterações morfológicas que ocorrem durante a maturação, como condensação dos cromossomos, rompimento da vesícula e reorganização das organelas, são reguladas principalmente pelo MPF com participação das proteínas MAPK (Adona *et al.*, 2015).

2.5 Produção *in vitro* de embriões (PIVE) suínos

A PIVE em suínos é uma biotécnica relativamente nova. Nos anos noventa nasceram os primeiros suínos cujos ovócitos foram maturados e fecundados *in vitro* (Mattioli *et al.*, 1989; Yoshida *et al.*, 1993), mas apenas uma década depois nasceram animais produzidos totalmente *in vitro* (Kikuchi *et al.*, 2002). Desde então, as técnicas de maturação, fecundação e cultivo *in vitro* se aprimoraram e tornou possível que outros laboratórios também obtivessem êxito (Somfai *et al.*, 2009; Nakamura, Tajima e Kikuchi, 2017). Essa técnica possui várias aplicações como por exemplo a intensificação da produção de embriões de alto valor genético, o que reforça os programas de melhoramento genético, permitindo importantes ganhos econômicos (Deschamps *et al.*, 2007).

A PIVE suína possui ainda outras aplicações como o uso da mesma para pesquisas biomédicas humanas, pois esses animais possuem grandes semelhanças fisiológicas com os seres humanos. O uso de tecido humano para desenvolvimento de técnicas para tratamentos e pesquisas em doenças humanas é restringido por questões éticas, portanto modelos animais são mais utilizados (Fagundes e Taha, 2004). Além disso, a clonagem e produção de animais transgênicos também são importantes áreas de abrangência da PIVE, sendo os suínos transgênicos amplamente utilizados como modelos para doenças humanas (Kragh *et al.*, 2009; Luo *et al.*, 2011) e xenotransplantes (Luo *et al.*, 2012; Zinovieva *et al.*, 2014).

O sucesso das TRAs depende em grande parte da boa qualidade dos embriões. Muitos estudos buscam melhorar os protocolos de PIVE, no entanto ainda há limitação para o uso da técnica devido aos problemas relacionados ao processo de produção *in vitro*. Dentre as principais limitações destacam-se a ineficiência da maturação nuclear, citoplasmática e molecular e da fecundação, alta taxa de polispermia e baixa eficiência no cultivo embrionário (Luo *et al.*, 2012; Grupen, 2014).

Além disso, a técnica possui uma baixa eficiência quando comparada com outras espécies e com a produção *in vivo* (Kikuchi, 2004; Grupen, 2014) e de acordo com a idade da fêmea, visto que fêmeas mais jovens possuem ovócitos de menor qualidade (O'brien *et al.*, 2000; Armstrong, 2001; Marchal *et al.*, 2001; Grupen *et al.*, 2003; Bagg *et al.*, 2007; Paczkowski *et al.*, 2011).

Um sistema de PIVE padrão inclui a maturação *in vitro* (MIV), fecundação *in vitro* (FIV) e cultivo *in vitro* (CIV), o que expõe o ovócito e o embrião a um ambiente de produção totalmente diferente do *in vivo*, no que se refere a temperatura, umidade, tensão de oxigênio e meios de cultivo. Esse ambiente totalmente adverso pode alterar processos metabólicos (Swain *et al.*, 2002) e até mesmo o padrão epigenético (Gregg, 2017) dos embriões produzidos *in vitro* quando comparados com os produzidos *in vivo*.

2.6 Epigenética

A epigenética tem se tornado cada vez mais o foco de pesquisas e estudo de processos biológicos não só em animais, como também em humanos e plantas. Células totipotentes, contendo as mesmas informações genéticas, ou seja, a mesma sequência de DNA ou genoma, conseguem se diferenciar em qualquer célula somática durante o desenvolvimento embrionário (Boland, Nazor e Loring, 2014). O mecanismo pelo qual isso ocorre é conhecido como epigenética (Franco, Marinho e Lunardelli, 2016). Conrad Waddington usou pela primeira vez, na década de 1940, o termo epigenética para se referir à interação entre genes e meio ambiente. Essa área recente da genética é definida como o estudo dos processos que alteram a expressão gênica e o fenótipo celular sem alterações no genótipo, gerando características herdáveis e que são reversíveis (Dupont, Armant e Brenner, 2009).

O padrão epigenético pode ser influenciado pelo meio ambiente (Dupont, Armant e Brenner, 2009). Atualmente, sabe-se que mecanismos epigenéticos estão associados à remodelação global da cromatina, controlando uma variedade de processos e doenças, como, câncer, obesidade e estresse (Esteller, 2008; Iacobuzio-Donahue, 2009; Van Dijk *et al.*, 2015). Através do estudo da epigenética, é possível associar essas doenças com alguma situação externa vivida pelos pais ou avós dos indivíduos, como desnutrição e estresse intenso (Kellermann, 2013). Assim, é possível que o padrão epigenético seja modificado através de fatores ambientais como idade, nutrição, fatores físicos (comportamento, temperatura, densidade populacional,

estresse), fatores químicos (toxinas e fármacos), levando, por exemplo, a hipermetilação de promotores de genes supressores de tumores, e consequente silenciamento dos mesmos (Faulk e Dolinoy, 2011).

Alguns fatores epigenéticos, como a metilação do DNA, modificações pós-traducionais das histonas e RNAs não-codantes (Fingerman *et al.*, 2012), têm um papel fundamental na gametogênese e embriogênese. Os dois primeiros estão ainda relacionados com diferenciação celular e tecidual, *imprinting* genômico, inativação do cromossomo X e silenciamento de elementos de transposição. Portanto, falhas nesses processos podem levar a alterações na competência dos gametas, morte embrionária e baixa eficiência das TRAs (Franco, Marinho e Lunardelli, 2016). Portanto, pesquisas que busquem compreender os eventos epigenéticos durante a gametogênese e embriogênese são necessários para que se possa melhorar a eficiência das TRAs (Franco, Marinho e Lunardelli, 2016).

2.6.1 Metilação do DNA

A metilação do DNA é um dos eventos epigenéticos mais estudados e é estabelecido pela transferência de um grupo metil (CH_3) para o carbono 5 de uma citosina, formando uma 5-metilcitosina - 5mC (Dupont, Armant e Brenner, 2009). Normalmente, as citosinas que recebem um CH_3 antecedem uma base guanina no DNA sendo chamados sítios CpG (Citosina-fosfato-Guanina). Em geral, metilação na região de promotores gênicos está associada com silenciamento do gene através da repressão da transcrição. Isso porque a 5mC impede fisicamente a ligação dos fatores de transcrição ao DNA (Franco, Marinho e Lunardelli, 2016). Além disso, DNA metilado pode recrutar proteínas que aumentam a compactação da cromatina (heterocromatina), prejudicando a ligação da RNA polimerase e consequentemente a transcrição gênica (Franco, Marinho e Lunardelli, 2016). Regiões com alta frequência de dinucleotídeos CpG são chamadas de ilhas CpGs e geralmente encontram-se não metiladas se presentes em promotores gênicos (Franco, Prickett e Oakey, 2014).

O processo de metilação de uma citosina é realizada por enzimas DNA Metiltransferases (DNMTs), que transferem o CH_3 da S-Adenosilmetionina (SAM) à base. Dentre as DNMTs existentes os subtipos DNMT1, DNMT3a e DNMT3b são os mais conhecidos. Existem ainda a DNMT2, DNMT3L e DNMT3C (Deplus *et al.*, 2002; Jurkowska, Jurkowski e Jeltsch, 2011; Barau *et al.*, 2016; Jeltsch *et al.*, 2017). Os mecanismos pelos quais as DNMTs metilam o DNA são através da metilação de

manutenção e metilação *de novo*. A primeira é responsável pela preservação dos padrões de metilação durante o processo de replicação do DNA e é geralmente catalisada pela DNMT1 (Shirane *et al.*, 2013). A DNMT1 usa como referência o padrão de metilação da fita velha usada como molde durante o processo de replicação semiconservativa do DNA para adicionar o CH₃ nas citosinas da nova fita. Portanto, a memória epigenética é mantida ao longo das divisões celulares (Franco, Marinho e Lunardelli, 2016).

O *locus* do gene da DNMT1 codifica três isoformas devido aos *splicings* alternativos, que são DNMT1o, DNMT1p e DNMT1s. A primeira é específica de ovócito, a segunda está presente em espermatoócitos em paquíteno e a terceira isoforma presente em células somáticas (Huan *et al.*, 2015). As DNMT1o e DNMT1p, presentes apenas em gametas e embriões pré-implantação, são essenciais para a reprogramação epigenética durante a gametogênese e durante o desenvolvimento embrionário inicial (Huan *et al.*, 2015).

O outro mecanismo de metilação do DNA, a metilação *de novo*, tem como principais catalisadores as DNMT3a e DNMT3b. Esse processo ocorre durante o desenvolvimento embrionário inicial em mamíferos (Stewart, Veselovska e Kelsey, 2016) e se caracteriza por criar um novo padrão de metilação no genoma (Shirane *et al.*, 2013), o que é essencial para o início da diferenciação celular no embrião. A DNMT3L, uma quarta isoforma, é um cofator das enzimas DNMT3a e DNMT3b (Shirane *et al.*, 2013). Existem ainda as isoformas DNMT2 e DNMT3C, responsáveis por metilação de moléculas de RNA (Goll *et al.*, 2006) e de elementos de transposição (Barau *et al.*, 2016), respectivamente.

O processo de desmetilação é menos compreendido. Uma enzima que catalisa uma desmetilação direta, ou seja, através da clivagem da ligação do grupo metil com a citosina ainda não foi descoberta, mas existem vias de desmetilação indireta em mamíferos (Seisenberger *et al.*, 2013), com desmetilação passiva e ativa. Na desmetilação passiva, durante a replicação do DNA, as citosinas das novas fitas de DNA deixam de receber o CH₃ por ausência da atividade da DNMT. Já na desmetilação ativa, sabe-se que as enzimas TETs (*Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenases*) e TDG (*thymine DNA glycosylase*) estão envolvidas (Kohli e Zhang, 2013; Macdonald e Mann, 2014).

As TETS oxidam o CH₃ da 5mC formando uma nova base, a 5-hidroximetilcitosina (5hmC). A oxidação da 5hmC forma uma outra base, 5-

formilcitosina (5fC), que parece ter um importante papel na embriogênese (Iurlaro *et al.*, 2016). A oxidação da 5fC leva a formação da 5-carboxicitosina (5caC). O processo de oxidação das citosinas modificadas está acoplado ao processo de Reparo por Excisão de Base (Seisenberger *et al.*, 2013). A TDG reconhece a 5fC ou a 5caC e remove essas bases, havendo então uma reparação e com isso uma nova citosina não metilada é recolocada (Kohli e Zhang, 2013).

2.6.2 Modificações de histonas

Além da metilação do DNA, as modificações pós-traducionais das histonas também são marcas epigenéticas contribuindo tanto para a inibição quanto para a ativação da transcrição gênica através da maior ou menor condensação da cromatina (Franco, Marinho e Lunardelli, 2016). A cromatina pode ser denominada de eucromatina – que permite a transcrição sendo mais abundante em genes ativos – e heterocromatina – de conformação mais fechada impedindo a transcrição dos genes. Aproximadamente 147 pares de base (pb) de DNA se enovelam em um octâmero de histonas formando uma estrutura chamada de nucleossomo – unidade básica da cromatina (Luger *et al.*, 1997; Miele *et al.*, 2008). Esse octâmero é formado por duas cópias das histonas H2A, H2B, H3 e H4, sendo que a histona H1 se liga externamente ao nucleossomo contribuindo para a organização da cromatina (Kouzarides, 2007).

As histonas estão sujeitas a vários tipos de modificações pós-traducionais, tais como metilação, acetilação, fosforilação, ubiquitinação, SUMOilação (Kouzarides, 2007), dentre outras. Essas modificações alteram o contato do DNA com o octâmero de histonas, tornando a cromatina mais aberta, eucromatina, ou mais fechada, heterocromatina (Smolle e Workman, 2013). A metilação pode ocorrer em resíduos de lisina e arginina nas caudas das histonas H3 e H4 (Kouzarides, 2007). As lisinas podem ainda ser mono, di ou trimetiladas e a depender do local onde ocorre altera a conformação da cromatina de diferentes formas, alterando a expressão gênica (Kouzarides, 2007). Por exemplo, uma trimetilação da lisina 27 da histona 3 (H3K27me3) é considerada uma marca de heterocromatina, ou seja, aumentam as cargas positivas e consequentemente aumentam a interação com o DNA, que possui carga negativa, tornando a cromatina mais fechada e menos susceptível à transcrição (Inoue *et al.*, 2017). A metilação de histonas é catalisada por enzimas denominadas Histonas Metiltransferases (HMTs) e a desmetilação por Histonas Desmetilases (HDMTs) (Xu e Andreassi, 2011).

A acetilação das histonas refere-se à adição de grupos acetil a resíduos de lisina. Geralmente, marcas de acetilação estão associadas a aumento da expressão gênica, pois diminuem as cargas positivas das histonas, tornando mais fraca a interação com o DNA. Muitas enzimas estão envolvidas nos processos de modificações das histonas (Kouzarides, 2007). A acetilação é catalisada pelas enzimas Histona Acetiltransferases (Shirane *et al.*, 2013), que transferem acetil a partir do composto acetil-CoA e a desacetilação é catalisada pelas Histona Desacetilases (HDACs), que removem os grupos acetil.

2.6.3 Reprogramação epigenética

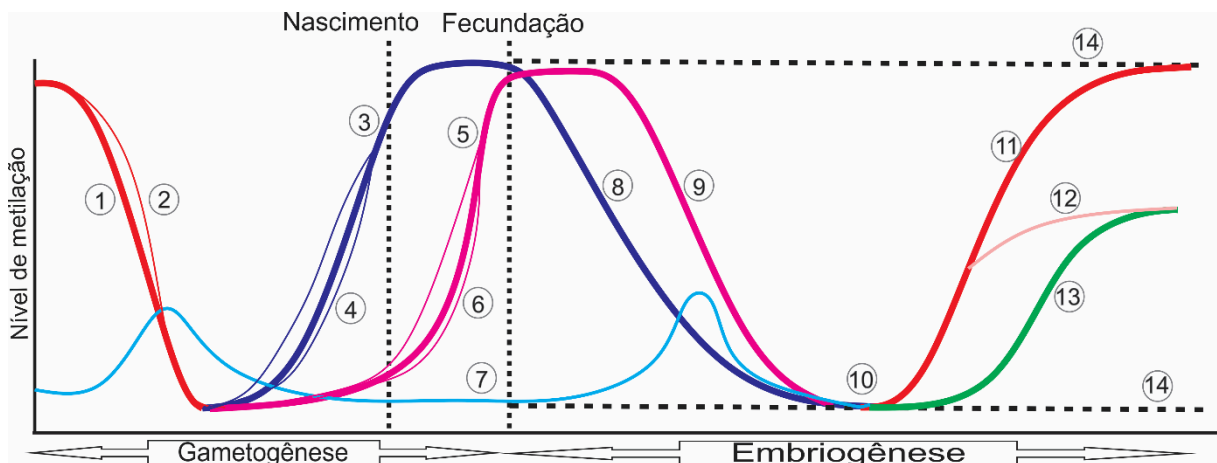
Em mamíferos, duas ondas de reprogramação epigenética ocorrem em dois períodos distintos do desenvolvimento: a primeira na gametogênese e a segunda durante a embriogênese inicial (Franco, Marinho e Lunardelli, 2016). Essa reprogramação epigenética está bem caracterizada em camundongos e está relacionada com a perda das marcas epigenéticas (marcas de histonas e metilação de DNA), seguindo do estabelecimento de um novo padrão epigenético. O primeiro ciclo da reprogramação de metilação do DNA (figura 1) começa nas CGPs, que, durante a migração para a crista gonadal, sofrem mitoses sucessivas e vão perdendo seus padrões de metilação, ainda durante a vida fetal (Hajkova *et al.*, 2008; Petkov, Reh e Anderson, 2009; Hyldig *et al.*, 2011). Nesse momento, há a perda também das marcas *imprinted* e reativação do cromossomo X inativo (Xi), tanto por desmetilação passiva quanto ativa (Hill, Amouroux e Hajkova, 2014). Ainda nesse período, inicia-se a gametogênese e, nas fêmeas, as células começam o processo de meiose e param em prófase I. No momento do nascimento do animal essas células encontram-se quase que totalmente desmetiladas (Macdonald e Mann, 2014). Já nos fetos machos, a meiose se iniciará apenas no início da puberdade do animal, no entanto, ainda na vida fetal, o processo de remetilação das proespermátogônias se inicia (Biermann e Steger, 2007). A desmetilação ativa culmina em acúmulo transitório de 5hmC e outras modificações das citosinas (Franco, Marinho e Lunardelli, 2016; Iurlaro *et al.*, 2016).

Na fêmea, mesmo antes da puberdade, os folículos primordiais estão sendo recrutados e os ovócitos começam a crescer, sendo esse o momento em que o ovócito começa a ser remetilado por metilação *de novo* (Franco, Marinho e Lunardelli, 2016), mas só após a puberdade todo esse processo termina por completo. Nesse processo também ocorrem as modificações de histonas e o estabelecimento do estoque

materno de mRNA (Daxinger e Whitelaw, 2012; Franco, Marinho e Lunardelli, 2016). Assim, o primeiro ciclo de reprogramação é concluído e, no momento da fecundação, ovócito e espermatozoide encontram-se altamente metilados (Reik, Dean e Walter, 2001).

O segundo ciclo ocorre logo após a fecundação. Nesse momento, o genoma paterno começa a perder suas marcas de metilação do DNA de forma ativa, ou seja, através da ação das TETs e TDG e no genoma materno essa desmetilação é de forma passiva, devido à remoção da DNMT1 do núcleo (Reik, Dean e Walter, 2001; Morgan *et al.*, 2005; Macdonald e Mann, 2014; Franco, Marinho e Lunardelli, 2016). O reestabelecimento dos padrões de metilação se dá através da metilação *de novo*, que em suínos acontece nos embriões a partir de 4 a 8 células (Telford, Watson e Schultz, 1990). As células do trofoblasto, que formarão os tecidos extraembrionários, adquirem um menor nível de metilação do que as células da massa celular interna, que originarão os diferentes tecidos do embrião (Reik, Dean e Walter, 2001; Morgan *et al.*, 2005; Faulk e Dolinoy, 2011; Franco, Marinho e Lunardelli, 2016).

Figura 1: Esquema da reprogramação da metilação do DNA durante a gametogênese e embriogênese inicial utilizando basicamente o modelo descrito em camundongo.



Durante a migração e proliferação das células primordiais germinativas para a crista gonadal, as mesmas perdem metilação (1 – linha vermelha), porém para algumas regiões diferencialmente metiladas (DMRs) essa perda ocorre mais tardiamente (2 – linha vermelha fina). Em fetos machos a aquisição da metilação *de novo* se dá ainda durante a vida fetal (3 – linha azul escura). Porém, nas fêmeas, essa aquisição do padrão de metilação *de novo* só ocorre após o nascimento, quando a mesma atinge a puberdade (5 – linha rosa escura). Algumas DMRs germinativas adquirem seus novos padrões de metilação de forma assíncrona (4 – linha azul escura fina e 6 – linha rosa escura fina). Quando os níveis de metilação do DNA caem, os níveis de 5hmC, 5fC e 5caC aumentam em consequência do processo de desmetilação ativa (representados pela linha azul clara – 7). No momento da fecundação os gametas já se encontram com os padrões de metilação definidos, inclusive os *imprinted*. Após a

fecundação, o genoma paterno sofre desmetilação ativa (8) e mais tardiamente o genoma materno sofre desmetilação passiva (9), conforme as células vão se dividindo. No estágio de 4-8 células em suínos (10), as células embrionárias começam a se diferenciar através da aquisição de metilação *de novo*. As células da massa celular interna (11 – linha vermelha) possui mais metilação do que as células do tecido extraembrionário (12 – linha rosa claro). Algumas DMRs, chamadas transientes, começam a receber metilação (13 - linha verde). Os genes *imprinted* mantêm seus padrões de metilação inalterados durante toda essa janela do desenvolvimento (14 – linhas pretas tracejadas). As curvas e eixos não estão representados em uma escala. Mais informações sobre a dinâmica da metilação do DNA podem ser encontradas no texto.

Fonte: a autora (2018).

Todas as células do organismo possuem o mesmo genoma, no entanto, para constituírem os diferentes tecidos do corpo, adquirem padrões epigenéticos específicos durante o desenvolvimento. Esse padrões, também chamados de epigenoma, são mantidos através de uma “memória epigenética” (Franco, Marinho e Lunardelli, 2016). O início do desenvolvimento é, portanto, uma das fases mais críticas da gestação. Isso porque, neste período, as fêmeas estão expostas a influências externas que podem afetar o epigenoma em estabelecimento, tanto da geração F1 quanto na F2, já que as CGPs dessas já estão sofrendo alterações nesse momento (Faulk e Dolinoy, 2011).

2.6.4 *Imprinting* genômico

Alguns genes apresentam um padrão epigenético diferente entre os alelos materno e paterno e em consequência disso, sua expressão é monoalélica determinada pela origem parental (Jaenisch, 1997). Esse padrão diferente refere-se principalmente à marca de metilação do DNA, estabelecida durante a gametogênese, onde um alelo encontra-se metilado e o outro desmetilado (Li, Beard e Jaenisch, 1993; Jaenisch, 1997; Barlow e Bartolomei, 2014). Esse mecanismo é conhecido como *imprinting* genômico. As marcas *imprinted* encontram-se em regiões de ilhas CpG conhecidas como Regiões Diferentemente Metiladas (DMRs) (Franco, Marinho e Lunardelli, 2016) e geralmente os genes *imprinted* encontram-se organizados em *clusters* nos cromossomos (Reik, Dean e Walter, 2001). Além disso, uma DMR que esteja regulando a expressão de mais de um gene *imprinted* é chamada de Região Controladora de *Imprinting* (ICR) (Franco, Marinho e Lunardelli, 2016).

Conforme observado na figura 1, durante o primeiro ciclo de reprogramação as marcas *imprinted* são apagadas nas CGPs e em seguida, são reestabelecidas de maneira sexo-específicas (Seisenberger *et al.*, 2013; Barlow e Bartolomei, 2014). Além disso, nas CGPs, as marcas de metilação *imprinted* são apagadas mais

tardamente que a metilação não *imprinted* (Hill, Amouroux e Hajkova, 2014) (Figura 1). Além disso, marcas *imprinted* podem também serem apagadas de forma assíncrona entre os embriões de sexos diferentes. Em suínos, a desmetilação do gene IGF2R e da ICR IGF2/H19 em CGPs, por exemplo, ocorrem em dias diferentes entre embriões machos e fêmeas (Petkov, Reh e Anderson, 2009; Hyldig *et al.*, 2011). O estabelecimento dos *imprinting* nos gametas também ocorre em momentos distintos (Franco, Marinho e Lunardelli, 2016), sendo no período pré-natal em machos e pós-natal em fêmeas.

Durante o segundo ciclo de reprogramação, as DMR germinativas (gDMR) mantêm suas marcas epigenéticas (Macdonald e Mann, 2014) ao longo do desenvolvimento embrionário (Figura 1). Proteínas maternas protegem essas regiões das perdas dessas marcas, que são então preservadas nas células somáticas (Fessele e Wright, 2017). Essa proteção contra o processo de desmetilação ativa é dada pela enzima Stella (também conhecida como PGC7 ou Dppa3), que se liga à H3K9me2 e evita a oxidação da 5mC (Denomme e Mann, 2013; Kang, Kalantry e Rao, 2013). A maioria das gDMRs são transientes, ou seja, eles sofrem reprogramação após a fecundação (Macdonald e Mann, 2014; Franco, Marinho e Lunardelli, 2016). Portanto, apenas a simples detecção da presença de uma gDMR nos gametas não significa que essa região irá controlar um gene *imprinted* em tecidos adultos (Fagundes *et al.*, 2011; Franco *et al.*, 2014; Macdonald e Mann, 2014).

Em suínos, alguns genes *imprinted* já foram relatados, sendo eles: DIRAS3, NAP1L5, PLAGL1, SGCE, PEG10, MEST, H19, IGF2, IGF2AS, PHLDA2, DLK1, MEG3, MAGEL2, NDN, SNURF-SNRPN, PEG3, NNAT e GNAS (Bischoff *et al.*, 2009; Niciura e Saraiva, 2014). Esses genes representam menos de 1% de todo o genoma, mas possuem importantes funções, como por exemplo, a regulação do crescimento fetal pelos genes IGF2/H19 (Lau *et al.*, 1994; Eggenschwiler *et al.*, 1997). A maioria dos genes *imprinted* está relacionada com função de crescimento e desenvolvimento fetal (Fessele e Wright, 2017); no entanto, outros possuem ainda funções de reguladores do ciclo celular, como o P57, inativação do cromossomo X, pelo gene XIST e genes relacionados com comportamento materno, como o MEST (Young e Fairburn, 2000).

2.7 Genes IGF2 e H19

O gene IGF2 (*Insulin-like Growth Factor 2*), também conhecido como somatomedina A, é um dos genes *imprinted* mais estudados. Possui um papel fundamental no crescimento fetal de mamíferos devido a sua ação mitogênica, promovendo a divisão e diferenciação celular (O'dell e Day, 1998; Gebert *et al.*, 2006). A proteína codificada por esse gene é formada por 67 aminoácidos, apresenta uma alta homologia com a Insulina e IGF1 e é produzida principalmente no fígado, no entanto possui atividades autócrinas e parácrinas (O'dell e Day, 1998).

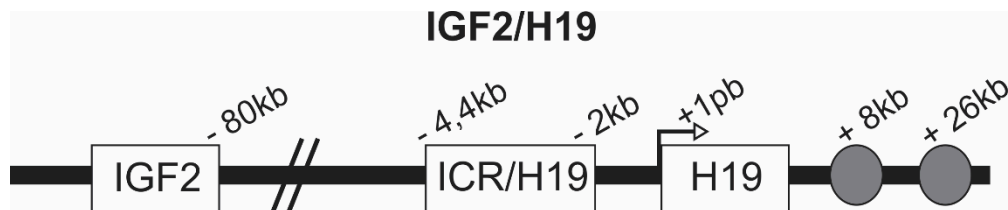
O IGF2 pode se ligar ao receptor de insulina ou receptor do tipo 1 e acarretar funções do tipo transporte de glicose e aminoácidos, estimular síntese de RNA e DNA, proliferação e diferenciação celular. Quando ligado ao receptor do tipo 2 (IGF2R), o qual também tem um controle *imprinted*, leva à sua degradação (O'dell e Day, 1998). O gene IGF2R é expresso pelo alelo materno e possui efeito contrário ao IGF2, pois o regula de forma negativa, ou seja, reduz a atividade de IGF2, pois ao se ligar a ele o mesmo é degradado (Frost e Moore, 2010).

O gene IGF2 está localizado no cromossomo 2 de suínos, possui 10 éxons e quatro promotores (Amarger *et al.*, 2002). Entre os éxons, apenas três codificam proteínas (7, 8 e 9), no entanto, todos são bem conservados e apresentam identidades que variam de 74 a 91% quando comparados ao IGF2 de humanos (Amarger *et al.*, 2002). O gene é expresso de forma monoalélica e sua regulação está diretamente relacionada com a ICR/H19, a qual possui três DMRs (Park *et al.*, 2009). Além disso, em camundongos, foram definidas mais três DMRs do gene IGF2, sendo duas intragênicas (Gomes, 2011). A primeira (DMR0), localizada no éxon 1, encontra-se desmetilada no alelo paterno. Já as DMRs 1 e 2 possuem padrão hipermetilado no alelo paterno, e encontram-se no promotor e no último éxon, respectivamente (Gomes, 2011).

O gene IGF2 é flanqueado pelos genes da Insulina (*upstream*) e H19 (*downstream*) (Amarger *et al.*, 2002) e a ICR/H19 encontra-se entre o IGF2 e o H19 (2,4 kb *upstream* de H19; figura 2) (Gebert *et al.*, 2016). O gene H19 produz um RNA não-codante de 2,3 kb (Ideraabdullah, Vigneau e Bartolomei, 2008). Esse gene também possui característica *imprinted* mas, diferentemente do IGF2, é expresso pelo alelo materno, participando da regulação do IGF2, bloqueando sua expressão. A região *downstream* ao H19 apresenta dois *enhancers* (8 e 26 kb *downstream* ao H19),

que são potencializadores da transcrição, e a 80 kb *upstream* ao local de início de transcrição do H19 encontra-se o IGF2 (Gebert *et al.*, 2016).

Figura 2: Estrutura do *locus* IGF2/H19 de camundongo mostrando a localização da ICR/H19 e dos genes IGF2 e H19.



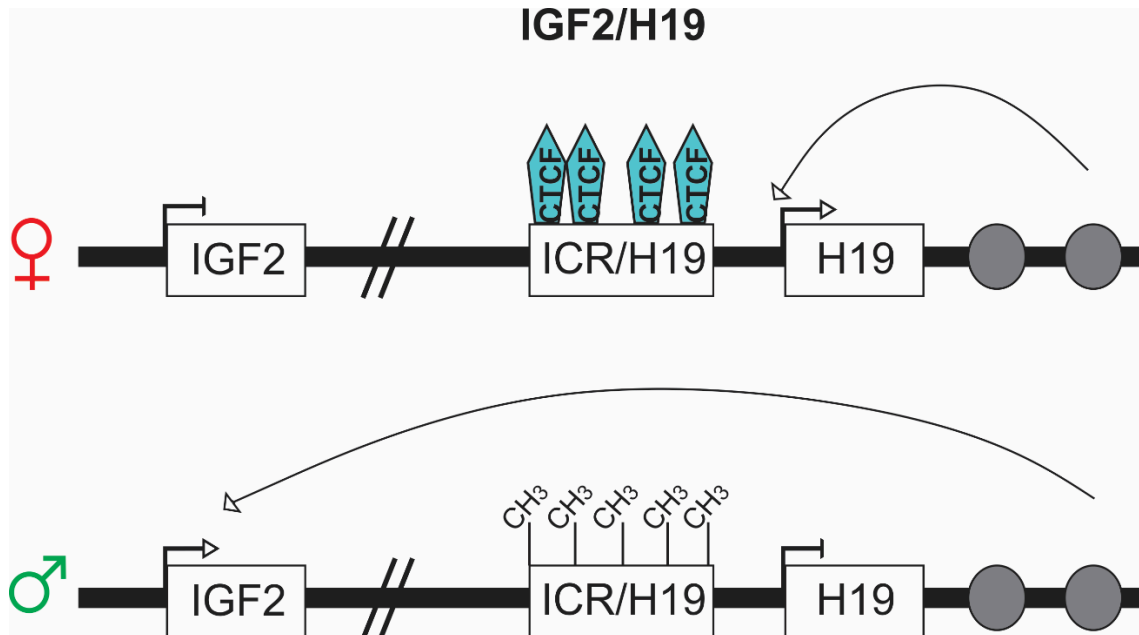
A ICR/H19 encontra-se entre os genes IGF2 e H19, 2,4kb *upstream* ao H19. IGF2 e H19 estão distantes 80kb. *Dowstream* ao H19 estão localizados os dois *enhancers* (8 e 26 kb respectivamente) que participam da regulação desse *locus*.

Fonte: a autora (2018).

A ICR/H19 regula a expressão de ambos os genes em *cis* e possui três funções bem definidas: (1) por ser a única gDMR no *locus*, é responsável por estabelecer os padrões de metilação diferentes entre alelo paterno e materno; (2) no alelo materno possui um papel de *insulator*, ou seja, um bloqueador da transcrição do IGF2; (3) e no alelo paterno promove o silenciamento do H19 (Figura 3) (Gebert *et al.*, 2016). Quando a ICR/H19 se encontra desmetilada, o que é o caso do alelo materno, a proteína conhecida como CTCF (Fator de Ligação CCCTC) se liga a essa região e a aproxima da DMR1 desmetilada do IGF2 formando um *loop* e impedindo fisicamente que o *enhancer* ative a transcrição de IGF2, mas permite a transcrição de H19 (Franco, Prickett e Oakey, 2014; Gebert *et al.*, 2016). Essa ICR é enriquecida por H3K4me que induz à formação do loop (Murrell, Heeson e Reik, 2004; Li *et al.*, 2005) e recrutamento do complexo PRC2 (Complexo Repressivo Policomb tipo 2) levando à metilação de H3K27 e consequente supressão de IGF2 (Franco, Prickett e Oakey, 2014).

Já no alelo paterno, cuja ICR/H19 possui padrão metilado, o CTCF não consegue se ligar, assim a região aumenta a afinidade pela DMR2 metilada de IGF2, o que permite que o *enhancer* e fatores de transcrição se aproximem do promotor do IGF2, permitindo a sua transcrição e bloqueando a transcrição do H19 (Gebert *et al.*, 2016). Nesse alelo a ICR é enriquecida por metilação do DNA e H3K9me, prevenindo a ligação do CTCF (Franco, Prickett e Oakey, 2014).

Figura 3: Esquema representando a regulação da expressão *imprinted* dos genes IGF2 e H19 em camundongos.



Na figura estão representados os alelos materno (♀) e paterno (♂). No alelo materno o CTCF (em azul) se liga à região desmetilada da ICR/H19 impedindo que os enhancers (bolinhas cinzas à direita) se aproximem da região promotora do gene IGF2, silenciando o mesmo. Os enhancers promovem a transcrição do gene H19 no alelo materno, representado pela seta fina. No alelo paterno a região ICR/H19 está metilada (CH₃), portanto não há ligação do CTCF e os enhancers se aproximam do promotor de IGF2, representado pela seta grossa, ocorrendo a transcrição deste.

Fonte: a autora (2018).

2.8 O gene XIST e a inativação do cromossomo X

A inativação do cromossomo X (ICX) foi descrita pela primeira vez por Mary F. Lyon em 1961 (Lyon, 1961). Esse evento ocorre em fêmeas mamíferas onde um dos dois cromossomos X é inativado no início do desenvolvimento embrionário para que haja uma compensação de dose, entre machos (XY) e fêmeas (XX), de genes transcritos desse cromossomo (Franco, Marinho e Lunardelli, 2016). Alguns mecanismos epigenéticos estão envolvidos na ICX, dentre eles metilação do DNA, metilação e acetilação de histonas e RNAs não-codantes (Ferreira e Franco, 2011).

Em camundongos, a ICX está bem caracterizada. O processo de inativação se inicia logo após a fecundação em uma região chamada Centro de Inativação de X (XIC) (Russell, 1963). Nessa região é produzido o transcrito XIST (*X-inactive specific transcript*), que é *imprinted* nessa espécie, e um transcrito antisense não-codante de XIST, chamado de TSIX, que tem função de impedir a transcrição de XIST. No início do desenvolvimento embrionário o cromossomo X paterno (Xp) está ativo nos zigotos

e já no estágio de quatro células o XIST inativa predominantemente o Xp, que possui uma “marca” de supressão transcricional derivada do processo de Inativação Cromossômica Sexual Meiótica (MSCI), ocorrido durante a espermatogênese (Huynh e Lee, 2003; Namekawa *et al.*, 2006). Durante a maturação do ovócito, o X materno (Xm) recebe uma marca que o protege da inativação (Ferreira e Franco, 2011).

No estágio de blastocisto, o Xp é reativado apenas nas células da massa celular interna (MCI), mantendo-se inativo nas células do trofoblasto, mas imediatamente após a reativação, um dos dois cromossomos X é inativado de forma aleatória (Takagi e Sasaki, 1975). As células da MCI, ou botão embrionário, vão originar as CGPs, e é durante a formação e crescimento do ovócito que ocorre o segundo ciclo de reativação do cromossomo X. Assim, nas CGP ambos os cromossomos X permanecem ativos e adquirem um sinal *imprinted*, que possibilita que o futuro cromossomo Xm resista à ICX na próxima geração (Lee, 2011; Inoue *et al.*, 2017).

O XIST é um RNA não-codante que atua em *cis*, expresso somente no cromossomo que será inativado (Xi), enquanto o TSIX é expresso somente no cromossomo X que permanecerá ativo (Xa) (Ferreira e Franco, 2011). No processo de ICX, com o início da diferenciação celular, uma cascata de eventos se inicia. Os cromossomos X se pareiam ou se aproximam, com a participação da proteína CTCF e um complexo de pluripotência (OCT4 e NANOG) (Navarro *et al.*, 2008; Donohoe *et al.*, 2009). Quando eles se separam, um dos cromossomos permanece com menor quantidade desse complexo pluripotência-CTCF (Xu *et al.*, 2007; Donohoe *et al.*, 2009). No cromossomo com maior quantidade desse complexo o TSIX é transcrito e recruta DNMT3A, que metila o promotor do XIST deixando-o inativo (Sado, Hoki e Sasaki, 2005; Sun, Deaton e Lee, 2006). Este será o futuro cromossomo X ativo. Já no outro cromossomo há expressão do XIST. Além disso, há expressão de RepA, um pequeno RNA, que está localizado na região 5' de XIST e recruta o complexo *Polycomb* PRC2 para esse cromossomo. Esse complexo se liga à região do RepA, favorecendo assim que o mRNA XIST comece a cobrir o cromossomo X em *cis* (Zhao *et al.*, 2008; Hoki *et al.*, 2009). Este será o futuro X inativo.

Além disso, o XIST recruta outros fatores de silenciamento que vão contribuir para a aquisição de marcas de histonas como H3K27me3 e H3K9me2/3, formando heterocromatina e consequentemente silenciando o cromossomo (Plath *et al.*, 2003). A inativação do cromossomo X é parcial, pois alguns genes no Xi escapam do processo de inativação (Carrel e Willard, 2005). A metilação do DNA ocorre como um

evento mais tardio, responsável pela manutenção do estado inativo do cromossomo (Jeon, Sarma e Lee, 2012).

Em suínos, a ICX e o gene XIST são amplamente estudados para a determinação da qualidade de células estaminais e na clonagem (Hwang *et al.*, 2013; Yuan *et al.*, 2014; Hwang *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2017; Ruan *et al.*, 2018), porém, ainda há pouca informação em gametas de suínos e principalmente comparando fêmeas em diferentes idades reprodutivas.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Determinar o padrão de metilação do gene XIST e da ICR/H19 de ovócitos imaturos e maturados *in vitro* oriundos de fêmeas suínas em diferentes fases reprodutivas: púberes (porcas cíclicas) e pré-púberes (marrãs).

3.2 Específicos

- Comparar o padrão de metilação da DMR1 da ICR/H19 entre ovócitos imaturos (GV) e ovócitos maturados *in vitro* (MII) de porcas cíclicas e marrãs pré-púberes.
- Comparar o padrão de metilação do éxon 1 do gene XIST entre ovócitos GV e MII de porcas cíclicas e marrãs pré-púberes.
- Associar os padrões de metilação à competência ovocitária.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Recuperação e seleção dos ovócitos

Ovócitos de marrãs pré-púberes e porcas cíclicas foram coletados de ovários provenientes de abatedouros localizados nas proximidades da cidade de Concordia-SC. Logo após o abate, os ovários de marrãs e porcas foram coletados e transportados em solução salina 0,9% (NaCl) até o laboratório da Embrapa Suínos e Aves em temperatura de 30 a 35 °C. Os ovários foram diferenciados por alguns critérios: primeiro, as fêmeas suínas foram abatidas em diferentes grupos (porcas e marrãs separadamente); além disso, em relação aos ovários das porcas, utilizou-se apenas ovários com pelo menos um corpo lúteo ou albicans.

Os ovários foram lavados com solução fisiológica aquecida a 36°C e os complexos cumulus ovócitos (COC) foram aspirados de folículos de 2 – 6 mm de diâmetro com auxílio de seringa de 10 ml e agulha 40 X 12 (18G). O líquido folicular era depositado em tubos de 50 ml (TPP®, Trasadingen, Suíça) para a sedimentação dos ovócitos por um período de 10 min em banho-maria. O sobrenadante foi removido com auxílio de pipeta sorológica de 20 ml e o sedimento ressuspensionado em meio HBT (*Hepes buffered Tyrode's*). Após a ressuspensão, o material obtido foi depositado em filtros peneira de nylon de 70 µm para separação celular. O filtro foi lavado com meio HBT e o meio depositado em placas de petri de 100 mm.

Os ovócitos foram localizados em esteriomicroscópio e transferidos para placas de Petri de 35 mm contendo 2 ml de meio HBT, sendo selecionados e avaliados morfológicamente quanto a homogeneidade do citoplasma e número de camadas de células do cumulus. Aqueles que apresentaram citoplasma homogêneo e mais de três camadas de células do cumulus foram utilizados. Após a seleção, os ovócitos foram divididos em quatro grupos experimentais:

- 1) Marrã Imaturo (mGV): ovócitos de marrãs imaturos, selecionados e desnudos por repetidas pipetagens;
- 2) Marrã Maduro (mMII): ovócitos de marrãs maturados *in vitro* e desnudos por repetidas pipetagens;
- 3) Porca Imaturo (pGV): ovócitos de porcas imaturos, selecionados e desnudos por repetidas pipetagens;
- 4) Porca Maduro (pMII): ovócitos de porcas maturados *in vitro* e desnudos por repetidas pipetagens;

4.2 Maturação *in vitro*

A maturação *in vitro* (MIV) dos ovócitos foi realizada de acordo com protocolo descrito por (Marques *et al.*, 2007). Resumidamente, os COCs foram maturados por 44 horas em meio TCM199 suplementado com glicose 3,05 mM, piruvato de sódio 0,91 mM, 50 UI/mL de gentamicina, cisteína 0,57 mM, fluido folicular suíno 10% (v/v), EGF 10 ng/mL e hormônios nas primeiras 22 h (10 UI/mL eCG e 10 UI/mL hCG) a 38°C, 5% de CO₂ e alta umidade.

Somente os ovócitos que extrusaram o primeiro corpúsculo polar foram considerados maturados e utilizados no experimento. Tanto os ovócitos imaturos

quanto os maturados *in vitro*, de ambos os grupos de animais, foram desnudados por repetidas pipetagens e congelados a -80°C com solução de PBS sem cálcio e magnésio para a posterior extração do DNA genômico.

4.3 Extração do DNA genômico

4.3.1 Extração do DNA de ovócitos

Para a extração do DNA foram utilizados 2 *pools* de 60 ovócitos para cada tratamento experimental (mGV, mMII, pGV e pMII). Os ovócitos foram incubados com pronase E (Sigma, Sto Louis MO, USA) para promover a digestão da zona pelúcida, em uma concentração de 10 mg/mL em termociclador (Eppendorf Mastercycler Gradient Thermal Cycler) a 37°C por 30 minutos e a 85°C por 15 minutos para inativação da enzima. O DNA foi extraído através de choque térmico, onde as amostras eram congeladas em nitrogênio líquido e imediatamente depois colocadas em termociclador a 95°C por 1 minuto. Esse processo foi repetido por cinco vezes. O DNA foi armazenado a -20°C .

4.3.2 Extração do DNA de espermatozoides

Foi utilizado sêmen de oito machos de linhagem comercial com idade entre 300 e 368 dias. O sêmen foi centrifugado e o *pellet* de espermatozoides ressuscitado e lavado duas vezes com 1 mL de PBS centrifugando a 13,000 rpm por 30 segundos. Os espermatozoides foram ressuscitados em 300 μL de uma solução de lise (50 mM de Tris, 5 mM de EDTA, 100 mM de NaCl, 2% de SDS, 0,3% de β -Mercaptoetanol, 5 mM de DTT e 0,5 mg/mL de proteinase K) e incubados *overnight* a 55°C . Posteriormente adicionou-se 100 μL de solução de precipitação de proteínas (NaCl 6 M) e levou ao vórtex por 30 segundos. Em seguida, incubou-se as amostras em gelo por 5 min e centrifugou por 8 min a 13,000 rpm a 4°C .

Após a transferência do sobrenadante para um novo tubo, foram adicionados 300 μL de Isopropanol gelado e inverteu-se os tubos por 10 vezes para a precipitação do DNA. As amostras foram incubadas a -20°C *overnight*. Em seguida, centrifugou-se novamente a 13,000 rpm a 4°C por 30 min. Em cada *pellet* adicionou-se 600 μL de etanol 70%, centrifugando por 10 min nas mesmas condições. O etanol foi removido por inversão dos tubos e com auxílio de uma pipeta. Os *pellets* secaram em temperatura ambiente por aproximadamente 10 minutos. O DNA foi então reidratado com 100 μL de solução TE (10 mM de Tris e 1 mM de EDTA) e armazenado a -20°C .

Para o tratamento com bissulfito de sódio e posterior análises de metilação do DNA, foram feitos dois pools de DNA genômico, cada um contendo DNA de 4 animais.

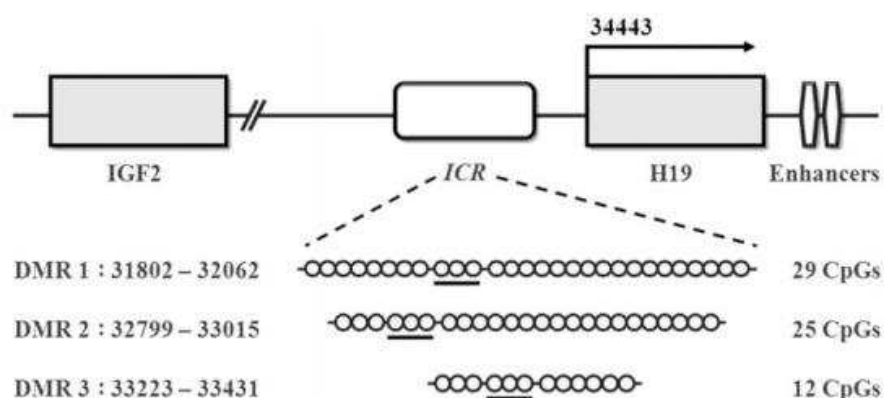
4.4 Tratamento com bissulfito de sódio

Para o tratamento com bissulfito de sódio utilizou-se o kit EZ DNA Methylation® (Zymo Research, Irvine, CA, USA), conforme as recomendações do fabricante. A técnica possibilita a conversão de citosinas não-metiladas em uracilas, mediada por bissulfito de sódio. O DNA tratado foi armazenado a -80°C para posterior utilização.

4.5 Amplificação do DNA

As amostras de DNA tratado com bissulfito de sódio foram submetidas à amplificação por *nested* PCR para a DMR1 da ICR/H19 e por *heminested* PCR para o éxon 1 do gene XIST utilizando o termociclador T100 Thermal Cycler (Bio-Rad). Foram realizadas PCR para o gene XIST e para a ICR/H19 para todas as amostras de DNA de ovócitos e espermatozoides. A localização da DMR1 da ICR/H10 está representada na figura 4. As sequências dos *primers* utilizados nas reações, acesso das sequências ao *GenBank*, localização, posição na ilha CpG e tamanho dos fragmentos amplificados estão mostrados na Tabela 1.

Figura 4: Localização da DMR1 da ICR/H19 de suínos



A localização das DMRs mostrada em números referem-se à sequência do *GenBank* (AY044827); A seta acima da caixa cinza clara indica o local de início da transcrição de H19; a caixa branca representa a ICR contendo três DMRs.; os círculos brancos representam os dinucleotídeos CpG dentro da região amplificada; os números ao lado dos círculos mostram a quantidade de CpGs presentes em cada DMR; as barras embaixo dos CpGs representam os sítios de ligação de CTCF;

Fonte: (Park *et al.*, 2009)

Ambas as PCR utilizando os *primers* externos foram conduzidas utilizando solução tampão 1 X; MgCl₂ 1,0 mM; dNTPs 0,4 mM; 1U de *Taq* DNA Polimerase Platinum® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10 pmoles de cada um dos *primers* (*forward* e *reverse*) e 3 µL de DNA tratado com bissulfito de sódio, sendo o volume de cada reação ajustado para 20 µL com água deionizada.

Para as PCR utilizando os *primers* internos as condições também foram as mesmas para XIST e ICR/H19: solução tampão 1 X; MgCl₂ 1,5 mM; dNTPs 0,4 mM; 1U de *Taq* DNA Polimerase Platinum® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10 pmoles de cada um dos *primers* (*forward* e *reverse*), 0,5 µL de *amplicon* da primeira PCR, sendo o volume de cada reação também ajustado para 20 µL com água deionizada (tabela 2). Foram realizadas 3 replicatas para cada reação, a fim de aumentar a quantidade de *amplicons* para posterior purificação.

Tabela 1. Identificação do Gene, sequências dos *primers*, código de acesso ao *GenBank*, localização dos *primers*, posição da ilha CpG e tamanho do fragmento amplificado.

Gene	Sequência dos <i>primers</i> (5'→3')	Acesso ao GenBank	Localização dos <i>primers</i>	Posição da ilha CpG	Tamanho do <i>amplicon</i>	Número de CpGs avaliados
XIST	F:AGTTATATTATGGGT GTTTTTGTTTTAG R:AAATTCAACCCATAT AACCTAAAATTCAAC	KC753464.1	1266-1867	Éxon 1	601 pb	
	F:AGGGATAATATGGTT GATTTTGTTATGTG R:AAATTCAACCCATAT AACCTAAAATTCAAC					
XIST	F:AGGAGATTAGGTTTA					
ICR/ H19*	GGGGAAT R:CTACCACTCCCCTC ATACCTAA	AY044827	31640- 32113	DMR1 ICR/H19	473 pb	
	F:AGTGTTTGGGGATTT					
ICR/ H19*	TTTTTTT R:CACCCCATCCCCTA AATAACCCTC	AY044827	31727- 31987	DMR1 ICR/H19	260 pb	29

*Park et al., 2009. (F) forward; (R) reverse; (pb) pares de base; (DMR1) região diferencialmente metilada 1 dentro da ICR/H19.

Os *amplicons* foram submetidos à eletroforese a corrente elétrica constante de 50 mA em gel de agarose 2,0% corado com brometo de etídio (10 mg/mL) em tampão TBE 0,5 X. Utilizou-se o marcador de peso molecular 1 Kb Plus DNA Ladder® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). O gel foi fotografado em um fotodocumentador (BioRad). Os *amplicons* foram recortados do gel e purificados utilizando o *kit* Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, Madison, WI, USA), de acordo com as normas do fabricante. Em seguida, as amostras foram quantificadas em espectrofotômetro NanoDrop® (ND- 1000) (Thermo Scientific, Asheville, NC, USA).

Tabela 2. Condições de amplificação utilizada nas *nested* PCR para o gene XIST e para a ICR/H19.

Gene	Reação	Desnaturação inicial	Ciclos			Extensão Final
			(45 ciclos na primeira reação e 30-45 na segunda)			
			Desnaturação	Anelamento	Extensão	
XIST	1ª reação	94ºC	94ºC	52ºC	72ºC	72ºC
		4min	40 s	1 min	1 min	15 min
	2ª reação	94ºC	94ºC	58ºC	72ºC	72ºC
		4min	40 s	1 min	1 min	15 min
ICR/ H19	1ª reação	94ºC	94ºC	54ºC	72ºC	72ºC
		4min	40 s	1 min	1 min	15 min
	2ª reação	94ºC	94ºC	58ºC	72ºC	72ºC
		4min	40 s	1 min	1 min	15 min

(min) minutos; (s) segundos.

4.6 Clonagem dos produtos da PCR e extração do DNA plasmidial

Após a purificação e quantificação, os *amplicons* de cada grupo foram inseridos no vetor TOPO TA Cloning® (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. A transformação foi realizada em células DH5α por choque térmico e o produto foi espalhado em placas de petri 90 x 15 mm contendo ágar com ampicilina 100 µg/mL, 40 µL de X-Gal (Sigma) a 20 mg/mL e 4 µL de IPTG 0,1 M (Sigma), seguida por

inversão das placas e incubação em estufa a 37°C por 14 horas e posteriormente a 4°C por duas horas.

Colônias brancas foram selecionadas para serem cultivadas em meio LuriaBertani (LB) líquido acrescido de ampicilina 100 µg/mL. Foi utilizado um palito de madeira estéril para a retirada da colônia da placa de cultivo e sua deposição no tubo de 15 mL contendo 3 mL de meio LB. Os tubos permaneceram sob agitação de 250 rpm a 37°C por 16 horas em agitador (New Brunswick Scientific Co, NJ, USA). Metade do conteúdo dos tubos foi utilizada para a extração do plasmídeo, segundo o protocolo de mini-preparação de plasmídeo (Sambrook e Russell, 2001), com pequenas modificações. As células foram centrifugadas e lavadas em PBS pH 7,4. Em seguida foram tratadas com uma solução contendo Tris 25 mM e EDTA 10 mM, acrescida de RNase A em uma concentração final de 10 µg/mL por amostra. A lise celular foi realizada com detergente em meio alcalino (NaOH 0,2 N e SDS 1%) e o DNA foi precipitado com acetato de potássio 3 M e ácido acético 5 M. As amostras foram incubadas *overnight* a -20°C com isopropanol 100% e tratadas com cloreto de lítio 500 mM. O DNA foi lavado sucessivamente com etanol 100% e 70% para purificação. Os *pellets* secos foram eluídos em 20 µL de água deionizada e o DNA quantificado em espectrofotômetro NanoDrop® (ND- 1000) (Thermo Scientific, Asheville, NC, USA).

4.7 Sequenciamento do DNA plasmidial e análise das sequências

As amostras de plasmídeo contendo o DNA de interesse foram digeridas com 5 U da enzima ECOR1 a 50 U/µL, 1 X de tampão H, 2 µL de DNA e o volume da reação ajustado para 10 µL com água deionizada. As amostras foram colocadas em banho-maria a 37°C *overnight*. Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com brometo de etídeo 10 mg/mL para confirmação da presença dos fragmentos. Amostras do DNA plasmidial a 50 ng/µL foram sequenciadas pelo método de Sanger utilizando o *primer* universal M13 *reverse*.

A qualidade do sequenciamento foi analisada utilizando o programa Chromas®. Para a quantificação do padrão de metilação utilizou-se os programas BiQ Analyser® e QUMA (Kumaki, Oda e Okano, 2008), comparando as sequências obtidas com uma referência depositada no *GenBank*, tanto para o gene XIST (KC753464.1) quanto para a ICR/H19 (AY044827). Neste estudo, considerou-se para avaliação apenas sequências que apresentaram no mínimo 95% de conversão pelo bissulfito de sódio – quando se observou a taxa de conversão das citosinas não seguidas de guanina –

e sequências com o mínimo de 95% de identidade – quando comparadas com a sequência referência.

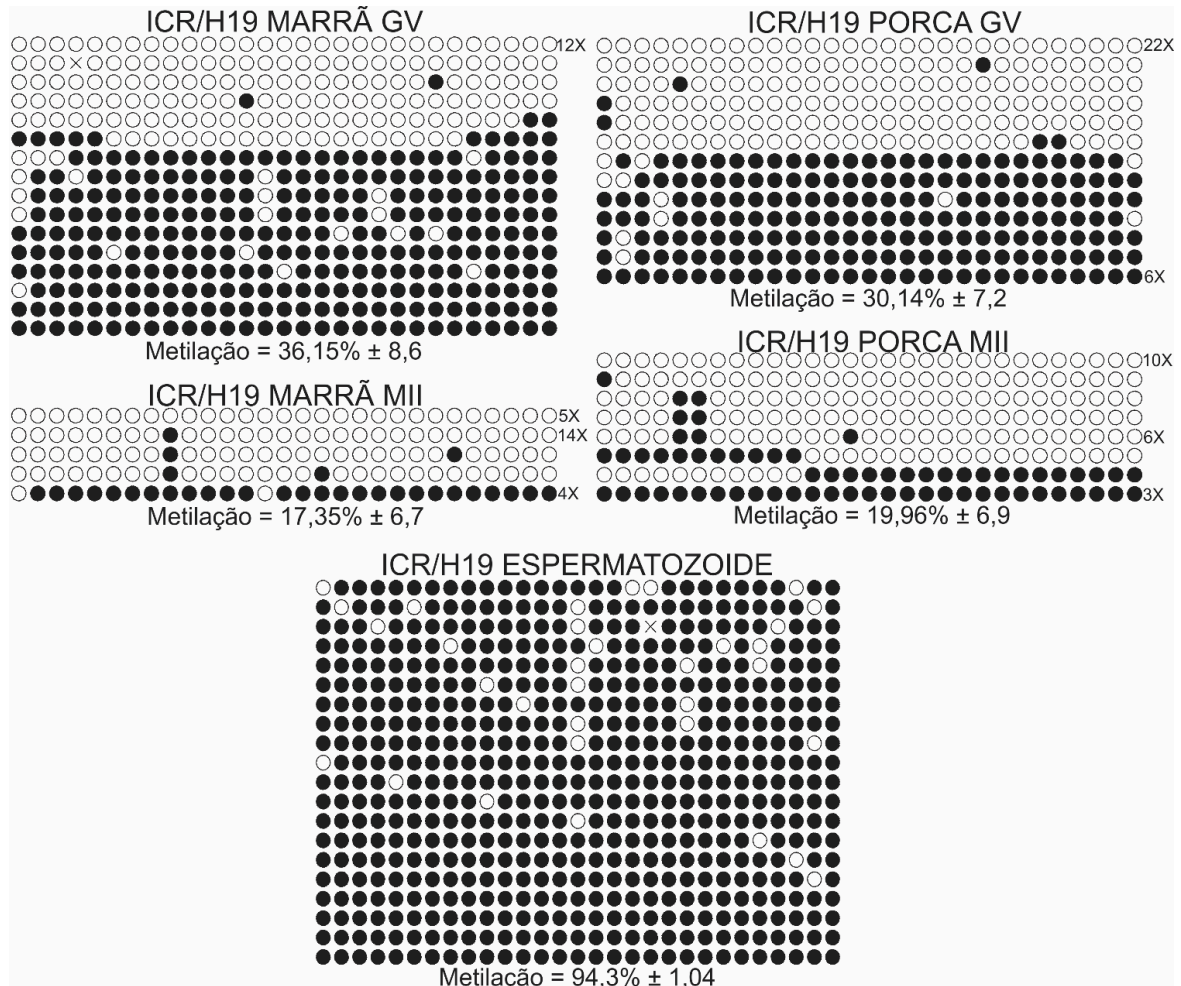
4.8 Análises estatísticas

Os dados de quantificação do padrão de metilação foram comparados entre os tratamentos experimentais utilizando-se análise de variância e teste de *Tukey* ou *Kruskal-Wallis* e *Mann-Whitney* se apresentaram distribuição normal ou não, respectivamente. Todas as análises foram realizadas utilizando o programa *Action* versão 2.9 (Equipe Estatcamp, 2014) e *GraphPad Prism* versão 7.00 (GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

5 RESULTADOS

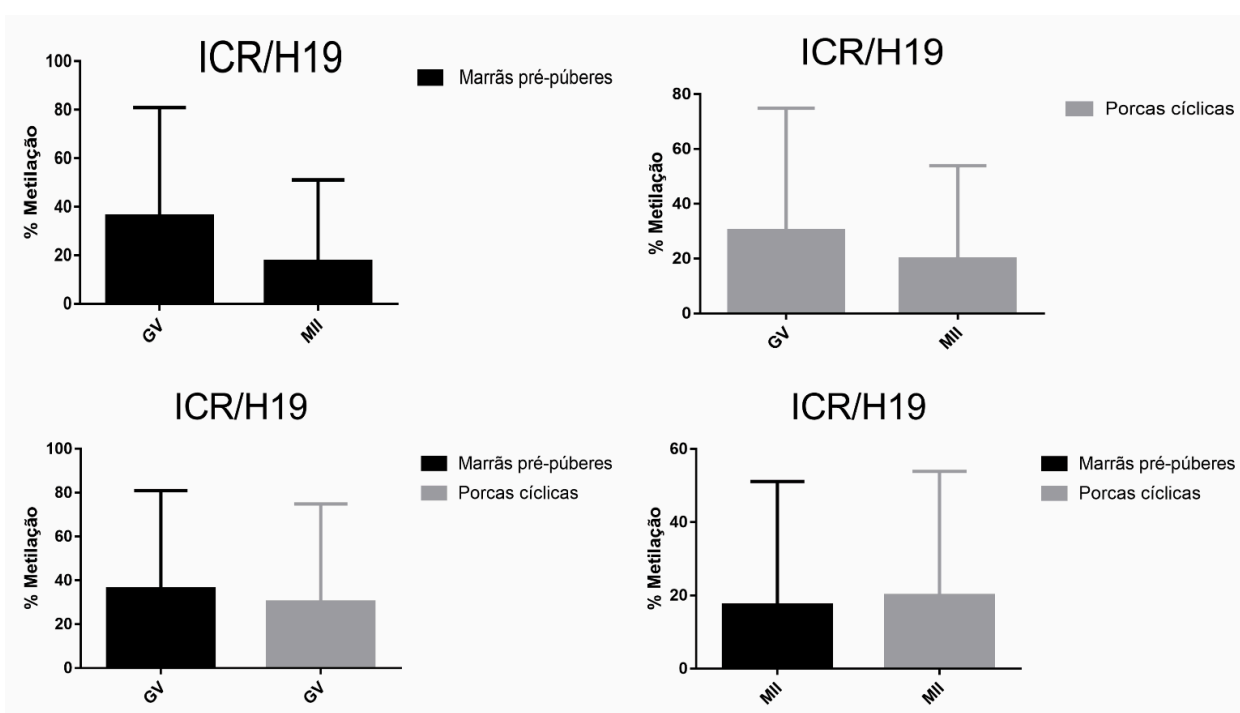
Em relação à ICR/H19, os grupos apresentaram os seguintes percentuais de metilação: mGV ($36,15 \pm 8,6\%$), pGV ($30,14 \pm 7,2\%$), mMII ($17,35 \pm 6,7\%$), pMII ($19,96 \pm 6,9\%$), conforme mostrado na figura 5. O padrão de metilação para espermatozoide, utilizado como controle, apresentou $94,3 \pm 1,04\%$ de metilação. Quando comparados os grupos mGV X mMII, mGV X pGV, pGV X pMII e mMII X pMII, os mesmos não apresentaram diferença estatística ($p > 0,05$) (figura 6). No entanto, quando comparados com espermatozoides, os ovócitos maturados de marrãs e porcas se apresentaram hipometilados (figura 7).

Figura 5: Padrão de metilação da ICR/H19 de ovócitos imaturos e maturados *in vitro* de marrãs pré-púberes e porcas cíclicas e espermatozoides de suínos, determinado por tratamento com bissulfito de sódio.



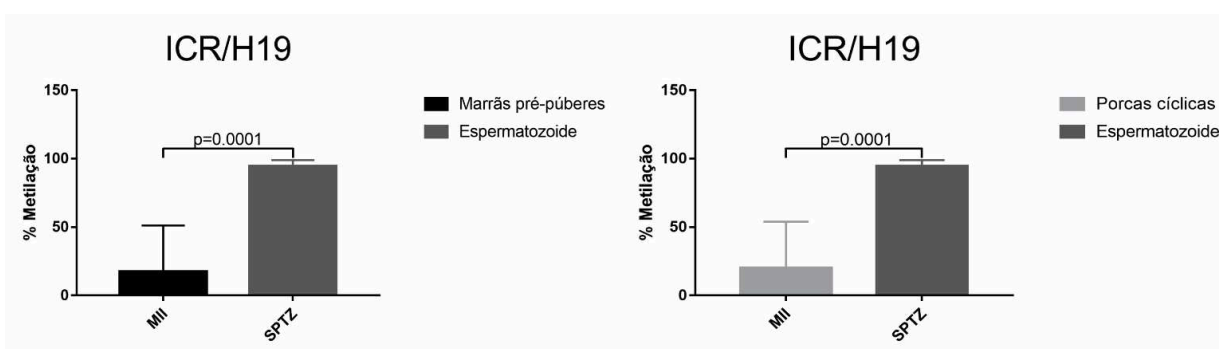
(GV) representa os ovócitos imaturos e (MII) os ovócitos maturados *in vitro*. Cada linha representa um clone individual. Os círculos brancos representam CpGs não metiladas e círculos pretos as CpGs metiladas. As CpGs que não puderam ser analisadas estão representadas por um X. Os números a direita de cada clone indicam o número de vezes que o alelo foi sequenciado. As porcentagens de metilação do DNA estão representados embaixo de cada grupo e foram apresentadas como média ± DP.

Figura 6: Comparação do padrão de metilação para a ICR/H19 entre ovócitos imaturos e maturados *in vitro* de marrãs pré-púberes e porcas cíclicas.



As barras pretas representam o grupo de marrãs e as barras cinzas o grupo de porcas. (GV) representa ovócitos imaturos e (MII) ovócitos maturados *in vitro*. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ DP.

Figura 7: Comparação do padrão de metilação da ICR/H19 entre ovócitos maturados *in vitro* de marrã pré-pubere e espermatozoides (esquerda) e entre ovócitos maturados *in vitro* de porca cíclica e espermatozoides (direita).

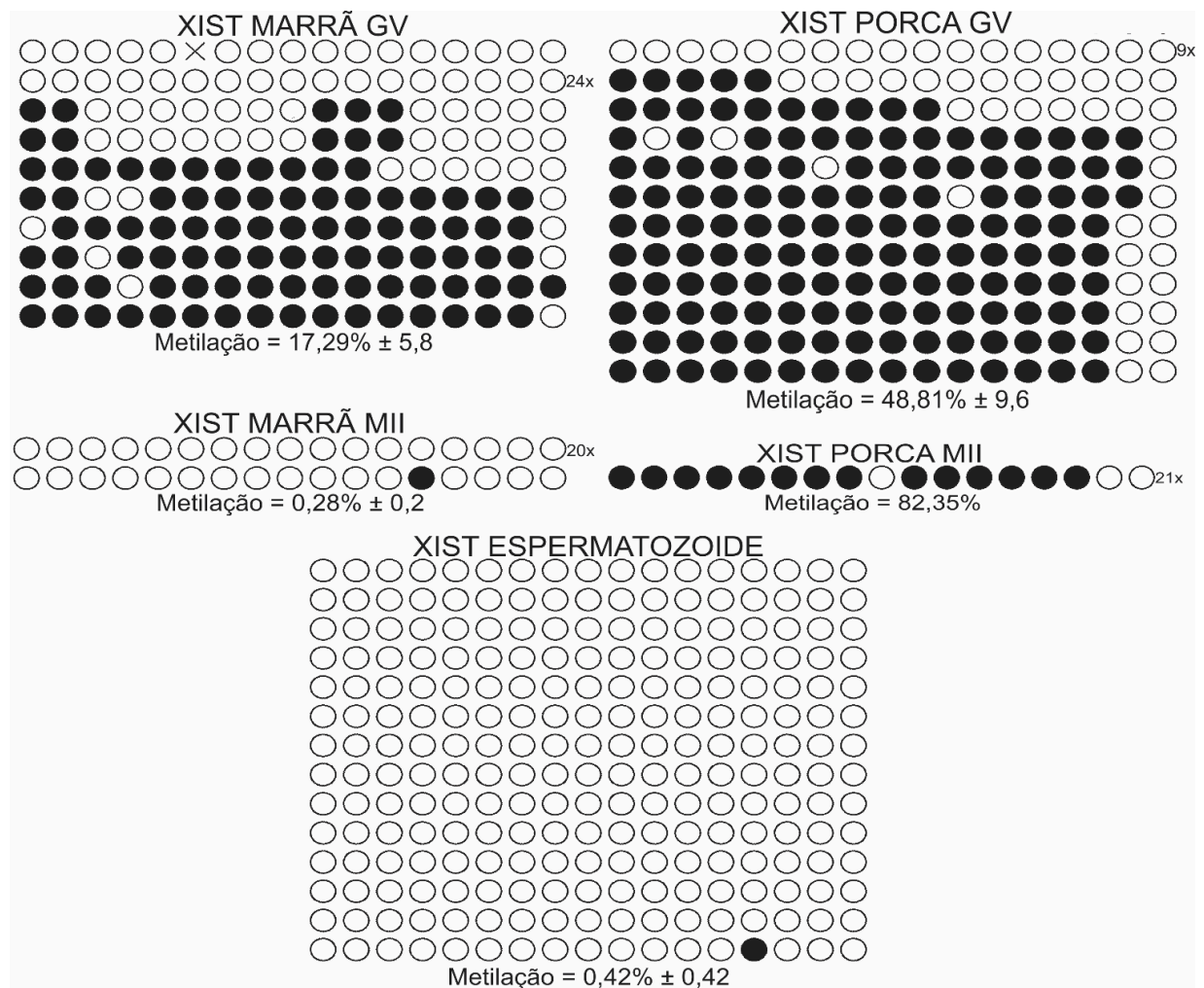


A barra preta representa o grupo de marrãs, a barra cinza claro o grupo de porcas e as barras cinza escuro os espermatozoides. (GV) representa ovócitos imaturos, (MII) ovócitos maturados *in vitro* e (SPTZ) espermatozoides de suínos. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ DP. Os valores de p estão representados acima das barras.

O gene XIST apresentou os seguintes percentuais de metilação para os diferentes grupos: mGV ($17,29 \pm 5,8\%$), pGV ($48,81 \pm 9,6\%$), mMII ($0,28 \pm 0,2\%$), pMII ($82,35\%$), conforme mostrado na figura 8. O padrão de metilação para

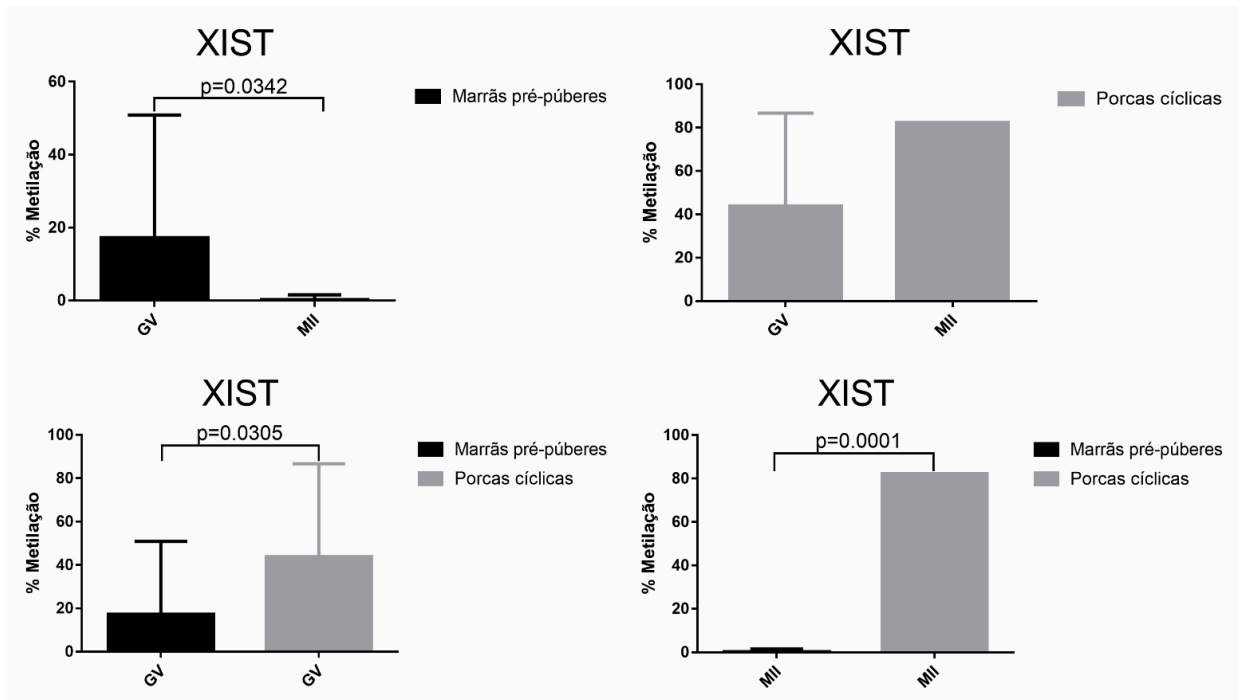
espermatozoide foi de $0,42 \pm 0,42\%$ de metilação. A comparação entre os grupos mostrou diferença estatística entre mGV X mMII ($p = 0,0342$), mGV X pGV ($p = 0,0305$) e entre mMII e pMII ($p = 0,0001$), conforme mostrado na figura 9. Quando comparado com espermatozoide, o padrão de metilação de mMII foi semelhante, porém, os ovócitos pMII foram mais metilados (figura 10).

Figura 8: Padrão de metilação do gene XIST de ovócitos imaturos e maturados *in vitro* de marrãs pré-púberes, porcas cíclicas e espermatozoides de suínos, determinado por tratamento com bissulfito de sódio.



(GV) representa os ovócitos imaturos e (MII) os ovócitos maturados *in vitro*. Cada linha representa um clone individual. Os círculos brancos representam CpGs não metiladas e círculos pretos as CpGs metiladas. As CpGs que não puderam ser analisadas estão representadas por um X. Os números a direita de cada clone indicam o número de vezes que o alelo foi sequenciado. As porcentagens de metilação do DNA estão representados embaixo de cada grupo e foram apresentadas como média $\pm$ DP.

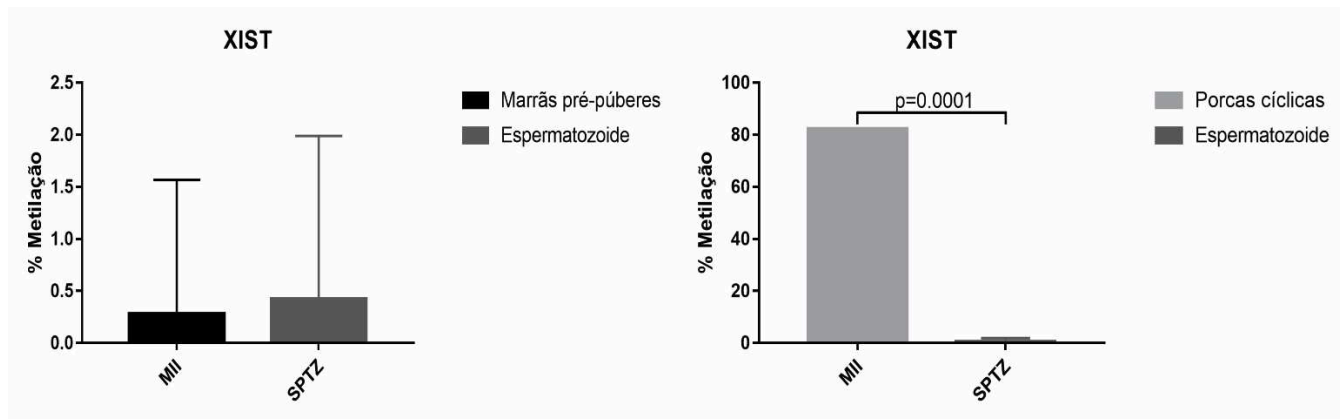
Figura 9: Comparação do padrão de metilação para o gene XIST entre ovócitos imaturos e maturados *in vitro* de marrãs pré-púberes e porcas cíclicas.



As barras pretas representam o grupo de marrãs e as barras cinzas o grupo de porcas. (GV) representa ovócitos imaturos e (MII) ovócitos maturados *in vitro*. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ DP. Os valores de p estão representados acima das barras.

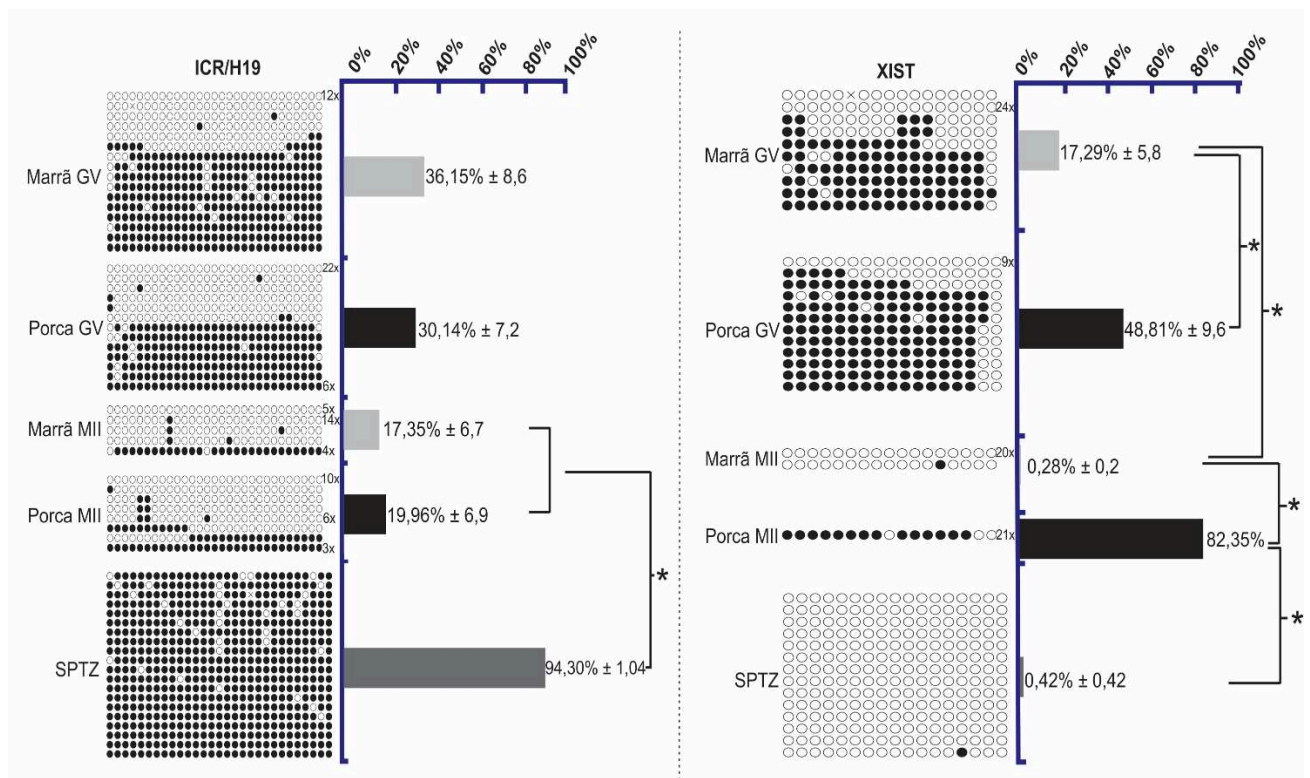
A figura 11 reúne todos os resultados obtidos nesse estudo sobre o padrão de metilação para as duas regiões estudadas, inclusive apresentando os dados de duas formas diferentes. A tabela 3 mostra a quantidade e porcentagem de alelos hipermetilados encontrados para cada grupo.

Figura 10: Comparação do padrão de metilação do gene XIST entre ovócitos maturados *in vitro* de marrã pré-púbere e espermatozoides (esquerda) e entre ovócitos maturados *in vitro* de porca cíclica e espermatozoides (direita).



A barra preta representa o grupo de marrãs, a barra cinza claro o grupo de porcas e as barras cinza escuro os espermatozoides. (GV) representa ovócitos imaturos, (MII) ovócitos maturados *in vitro* e (SPTZ) espermatozoides de suínos. Os resultados foram apresentados como média $\pm$ DP. O valor de p está representado acima das barras.

Figura 11: Padrão de metilação em formato de círculos e de barras para as duas regiões (ICR/H19 e XIST).



À esquerda estão representados os resultados para a ICR/H19 e à direita os resultados para o gene XIST. (GV) representa os ovócitos imaturos, (MII) os ovócitos maturados *in vitro* e (SPTZ) os espermatozoides de suínos. Cada linha representa um clone individual. Os círculos brancos representam CpGs não metiladas e círculos pretos as CpGs metiladas. As CpGs que não puderam

ser analisadas estão representadas por um X. Os números a direita de cada clone indicam o número de vezes que o alelo foi sequenciado. As barras cinza claro representam o grupo de marrãs, as barras pretas o grupo de porcas e as barras cinza escuro os espermatozoides. Os valores de porcentagem de metilação estão à direita de cada barra e foram apresentados como a média. Os grupos que apresentaram diferença estatística entre si estão representados por linhas pretas e *.

Tabela 3: Porcentagem de metilação, número de sequências analisadas, número mínimo de alelos e número de sequências hipermetiladas encontrados para cada grupo, para o gene XIST e para a ICR/H19

Gene	Grupos	Porcentagem de metilação de DNA $\pm$ DP	Nº de sequências analisadas	Número mínimo de alelos	Número de sequências hipermetiladas
ICR/H19	mGV	36,15 $\pm$ 8,6	27	14	10 (37,03%)
	pGV	30,14 $\pm$ 7,2	39	11	12 (30,76%)
	mMII	17,35 $\pm$ 6,7	25	5	4 (16%)
	pMII	19,96 $\pm$ 6,9	24	7	4 (16,66%)
	Espermatozoide	94,30	20	17	20 (100%)
XIST	mGV	17,29 $\pm$ 5,8	33	9	5 (15,15%)
	pGV	48,81 $\pm$ 9,6	20	7	10 (50%)
	mMII	0,28 $\pm$ 0,2	21	2	0 (0%)
	pMII	82,35	21	1	21 (100%)
	Espermatozoide	0,42	14	2	0 (0%)

(mGV) ovócitos de marrãs pré-púberes imaturos; (pGV) ovócitos de porcas cíclicas imaturos; (mMII) ovócitos de marrãs pré-púberes maturados *in vitro*; (pMII) ovócitos de porcas cíclicas maturados *in vitro*

6 DISCUSSÃO

Com relação aos resultados encontrados para a ICR/H19, não houve diferenças entre os grupos experimentais. Para os ovócitos de ambos os grupos, marrãs pré-púberes e porcas cíclicas, os padrões de metilação se mostraram os mesmos, tanto para ovócitos GV quanto para MII. Isso mostra que os ovócitos de marrãs, que sabidamente têm menor competência (O'Brien *et al.*, 2000; Armstrong, 2001; Marchal *et al.*, 2001; Grupen *et al.*, 2003; Bagg *et al.*, 2007; Paczkowski *et al.*, 2011), conseguiram se reprogramar, para esse *locus* especificamente, de maneira correta durante a MIV, pois os ovócitos mMII apresentaram um padrão semelhante aos ovócitos pMII.

O padrão de metilação entre ovócitos MII de porcas ou marrãs foram estatisticamente iguais entre si, mas diferentes de espermatozoide. O *locus* IGF2/H19 tem um controle *imprinted*, cujo padrão normal é hipermetilado no alelo paterno e hipometilado no alelo materno, padrão que corrobora com o que foi encontrado nesse trabalho e encontrado por (Park *et al.*, 2009). Esses autores, estudando as três DMRs presentes na ICR/H19, encontraram que ovócitos de suínos maturados *in vitro* apresentaram 10,1% de metilação e os espermatozoides 96,7%, indicando que o gene é regulado por um padrão diferencialmente metilado entre os alelos materno e paterno, ou seja, de maneira sexo-específica (Park *et al.*, 2009). Park *et al* (2009) também avaliaram o padrão de metilação em tecido pulmonar adulto e encontraram um padrão hemimetilado, o que confirma um padrão *imprinted*. Park *et al* (2011) também encontraram esse mesmo padrão para a região IGF2/H19 em ovócito maturado de marrã pré-púbere (13,6%), espermatozoide (78,1%) e tecido hepático adulto (43,1%), confirmando o controle *imprinted* do *locus* em suínos.

Portanto, quando tomados em conjunto os resultados aqui apresentados para a ICR/H19 e os de Park e colaboradores (2009 e 2011), nota-se que essa região se trata de uma gDMR, cujas marcas *imprinted* são determinadas durante a gametogênese e se mantêm após a fecundação. Han e colaboradores (2008), avaliando o padrão de metilação também na DMR1 da ICR/H19, encontraram 73,4% de metilação em espermatozoides e 5,2% em ovócitos MII de marrãs pré-púberes. Além disso, avaliaram também o padrão de metilação na região do último éxon do IGF2 e encontraram 87,7% e 19,3% para espermatozoides e ovócitos, respectivamente (Han *et al.*, 2008).

Uma correta reprogramação epigenética dos genes *imprinted* é de extrema importância para um correto desenvolvimento embrionário em mamíferos (Reik, Dean e Walter, 2001; Amoako, Nafee e Ola, 2017). Por isso, o *locus* IGF2/H19, que está relacionado com desenvolvimento embrionário, placentação e crescimento fetal, tem sido constantemente estudado em várias espécies de mamíferos. Fagundes e colaboradores (2011), estudando o último éxon do gene IGF2 em ovócitos imaturos e maturados *in vitro* de bovinos, mostraram, diferentemente do que foi apresentado aqui, que o padrão de metilação é diferente entre ovócitos mais e menos competentes. O critério utilizado por esses autores, para menor ou maior competência, foi o tamanho do folículo, de 1-3 mm e > 8 mm, respectivamente (Fagundes *et al.*, 2011).

Mendonça e colaboradores (2015) também avaliaram o padrão de metilação no último éxon do IGF2 de bovinos durante a folículo-logênese. Os autores não encontraram diferença estatística entre ovócitos de folículos primordiais ($73,74 \pm 2,88$) e MII ($56,35 \pm 4,45$), porém encontraram entre ovócitos MII e espermatozoides (96,04%) (Mendonça *et al.*, 2015), o que está de acordo com nossos resultados, pois apesar de não termos estudado a mesma região genômica, as duas participam juntas da regulação do *locus* IGF2/H19 (Franco, Prickett e Oakey, 2014).

Park e colaboradores (2009) também encontraram heterogeneidade no padrão de metilação dos ovócitos maturados, ou seja, os alelos que se encontram hipermetilados. De acordo com esses autores, isso ocorre devido aos sistemas de maturação *in vitro* inadequados, ou seja, as condições usadas para maturação ainda são subótimas ou que os ovócitos de baixa qualidade não foram rigorosamente eliminados. Fagundes *et al* (2011) e Mendonça *et al* (2015) também encontraram alelos hipometilados e hipermetilados nos ovócitos maturados *in vitro* de bovinos. Fagundes *et al* (2011) encontraram 40% de alelos hipermetilados e Mendonça *et al* (2015) encontraram 17%. Nossos resultados mostraram 16% de alelos hipermetilados em ovócitos MII, tanto de marrãs quanto de porcas (tabela 3).

Considerando que o padrão de metilação para essas duas regiões do DNA já está relativamente bem estabelecido na literatura, tanto para bovinos, camundongos, humanos, quanto para suínos e define que o alelo materno tem um padrão desmetilado (Gebert *et al.*, 2006; Lewis e Reik, 2006), sugerimos que esses alelos hipermetilados encontrados pode ser devido aos efeitos adversos da MIV (Park *et al.*, 2009) ou devido a uma heterogeneidade dos ovócitos utilizados, por exemplo aspirados de folículos de diferentes tamanhos (Caixeta *et al.*, 2009).

Com relação aos resultados para o gene XIST, os padrões de metilação encontrados foram diferentes quando comparadas três situações. Conforme os resultados apresentados, observa-se que essa região ganha metilação conforme a idade reprodutiva da fêmea (figura 9), ou seja, de marrã para porca há um aumento da metilação tanto entre ovócitos imaturos quanto entre ovócitos maturados *in vitro*. Ovócitos de pGV estão mais metilados que de mGV, o que significa que provavelmente o ovócito de marrã não teve competência para ganhar metilação *de novo* quanto teve o ovócito de porca. Surpreendentemente os ovócitos de marrãs perderam metilação durante a MIV (figura 9), quando se esperava ganho de metilação, pois a literatura mostra que essa DMR do XIST se encontra hipermetilada em ovócitos

e hipometilada em espermatozoides (Zuccotti e Monk, 1995; Mendonça, 2017). Estes dados da literatura corroboram nossos resultados para os ovócitos de porca, os quais se encontram hipermetilados quando atingem MII (figuras 8, 9 e 10). Quando se comparou ovócitos mMII e pMII observou-se dois extremos, onde pMII apresentou um padrão hipermetilado e mMII hipometilado (figuras 8 e 9). Isso mais uma vez sugere que os ovócitos de mães, menos competentes, foram inábeis para ganhar metilação *de novo*. Assim, a reprogramação epigenética dessa região do XIST pode estar relacionada à competência e tem potencial para ser um marcador epigenético para competência ovocitária.

Esse padrão hipometilado do ovócito mMII, semelhante ao de espermatozoide, pode ser um entrave ao correto desenvolvimento embrionário se considerarmos que essa região possa estar participando do controle da expressão do XIST e em consequência da iniciação do processo de ICX (Mohandas, Sparkes e Shapiro, 1981; John e Surani, 1996; Augui, Nora e Heard, 2011; Wijchers e Festenstein, 2011). Ruan e colaboradores (2018) avaliaram o efeito da superexpressão de XIST na clonagem e observaram que esse evento, associado à persistência da marca de H3K9me3, são responsáveis por anormalidades na transferência nuclear de células somáticas (SCNT) (Ruan *et al.*, 2018).

Os autores compararam o transcriptoma de fetos suínos clones normais, fetos clones anormais e fetos não-clones e observaram que os clones anormais, de ambos os sexos, apresentavam expressão de XIST aumentada, enquanto os clones normais e não-clones tinham níveis de expressão de XIST semelhantes (Ruan *et al.*, 2018). Quando fizeram uma *downregulation* do XIST nas células doadoras de núcleos, eles conseguiram aumentar a eficiência da SCNT. Ruan e colaboradores não conseguiram explicar os mecanismos pelos quais a menor expressão de XIST melhora o desenvolvimento de embriões suínos clones no estágio inicial de desenvolvimento. Porém, observaram que a *downregulation* de XIST nas células doadoras normalizou a expressão de genes relacionados a pluripotência e que os níveis de desmetilação do DNA para alguns genes como POU5F1, XIST e IGF2 diminuíram, se tornando mais parecidos com os de embriões PIVE. Além disso, os níveis de expressão de genes relacionados a modificações das histonas também se tornaram semelhantes aos de embriões PIVE, assim como o nível de H3K9me3, que segundo eles é considerado uma barreira epigenética para a reprogramação (Ruan *et al.*, 2018).

Yuan *et al* (2014) também encontraram expressão aumentada e uma diminuição da metilação do gene XIST em fetos clones abortados machos e fêmeas em comparação com os controles (Yuan *et al.*, 2014). Esses resultados, junto aos que encontramos para ovócito MII de marrãs, mostram que o padrão hipometilado e a expressão aumentada de XIST é prejudicial para o desenvolvimento embrionário e sugerem que os mecanismos regulando a expressão de XIST podem estar relacionados à competência do ovócito.

7 CONCLUSÕES

Nesse trabalho foi determinado o padrão de metilação do gene XIST e da ICR/H19 de ovócitos GV e MII de marrãs pré-púberes e porcas cíclicas. Observou-se que a DMR1 da ICR/H19 não sofreu alteração desse padrão, independentemente da idade reprodutiva da fêmea e, portanto, essa região não pode ser utilizada como um marcador molecular de competência ovocitária. Porém, quando comparado com espermatozoide, essa região possui um padrão diferente, o que é característica de controle *imprinted*.

Com relação ao padrão de metilação para a DMR do éxon 1 do gene XIST, este apresentou-se totalmente diferente entre marrãs e porcas. De forma geral, os ovócitos de marrãs possuem menor porcentagem de metilação e os ovócitos MII apresentam um padrão igual ao de espermatozoides, que é desmetilado. Portanto, sugere-se que o padrão desmetilado para o XIST pode estar associado a menor competência dos gametas de fêmeas jovens, tornando o perfil epigenético dessa região um potencial candidato a marcador de competência ovocitária.

REFERÊNCIAS

- ADONA, P. R. et al. Ovogênese e foliculogênese em mamíferos. **Journal of Health Sciences**, v. 15, n. 3, 2015. ISSN 2447-8938.
- AMARGER, V. et al. Comparative sequence analysis of the INS-IGF2-H19 gene cluster in pigs. **Mamm Genome**, v. 13, n. 7, p. 388-398, 2002. ISSN 0938-8990. <https://doi.org/10.1007/s00335-001-3059-x>
- AMOAKO, A. A.; NAFEE, T. M.; OLA, B. Epigenetic Influences During the Periconception Period and Assisted Reproduction. In: (Ed.). **Periconception in Physiology and Medicine**: Springer, 2017. p.15-39. https://doi.org/10.1007/978-3-319-62414-3_2
- ARMSTRONG, D. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. **Theriogenology**, v. 55, n. 6, p. 1303-1322, 2001. ISSN 0093-691X. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00484-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00484-8)
- AUGUI, S.; NORA, E. P.; HEARD, E. Regulation of X-chromosome inactivation by the X-inactivation centre. **Nature Reviews Genetics**, v. 12, n. 6, p. 429, 2011. ISSN 1471-0064. <https://doi.org/10.1038/nrg2987>
- BAGG, M. A. et al. Relationship between follicle size and oocyte developmental competence in prepubertal and adult pigs. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 7, p. 797-803, 2007. ISSN 1448-5990. <https://doi.org/10.1071/RD07018>
- BARAU, J. et al. The DNA methyltransferase DNMT3C protects male germ cells from transposon activity. **Science**, v. 354, n. 6314, p. 909-912, 2016. ISSN 0036-8075. <https://doi.org/10.1126/science.aah5143>
- BARLOW, D. P.; BARTOLOMEI, M. S. Genomic imprinting in mammals. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 6, n. 2, p. a018382, 2014. ISSN 1943-0264. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018382>
- BIERMANN, K.; STEGER, K. Epigenetics in male germ cells. **Journal of Andrology**, v. 28, n. 4, p. 466-480, 2007. ISSN 1939-4640. <https://doi.org/10.2164/jandrol.106.002048>
- BISCHOFF, S. R. et al. Characterization of conserved and nonconserved imprinted genes in swine. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 5, p. 906-920, 2009. ISSN 0006-3363. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.109.078139>
- BOLAND, M. J.; NAZOR, K. L.; LORING, J. F. Epigenetic regulation of pluripotency and differentiation. **Circulation Research**, v. 115, n. 2, p. 311-324, 2014. ISSN 0009-7330. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.115.301517>
- CAIXETA, E. S. et al. Effect of follicle size on mRNA expression in cumulus cells and oocytes of *Bos indicus*: an approach to identify marker genes for developmental competence. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 21, n. 5, p. 655-664, 2009. ISSN 1448-5990. <https://doi.org/10.1071/RD08201>
- CAN, A.; SEMIZ, O.; CINAR, O. Centrosome and microtubule dynamics during early stages of meiosis in mouse oocytes. **Molecular Human Reproduction**, v. 9, n. 12, p. 749-756, 2003. ISSN 1360-9947. <https://doi.org/10.1093/molehr/gag093>

CARREL, L.; WILLARD, H. F. X-inactivation profile reveals extensive variability in X-linked gene expression in females. **Nature**, v. 434, n. 7031, p. 400, 2005. ISSN 1476-4687. <https://doi.org/10.1038/nature03479>

DAXINGER, L.; WHITELAW, E. Understanding transgenerational epigenetic inheritance via the gametes in mammals. **Nature Reviews Genetics**, v. 13, n. 3, p. 153, 2012. ISSN 1471-0064. <https://doi.org/10.1038/nrg3188>

DE LA FUENTE, R.; EPPIG, J. J. Transcriptional activity of the mouse oocyte genome: companion granulosa cells modulate transcription and chromatin remodeling. **Developmental Biology**, v. 229, n. 1, p. 224-236, Jan 01 2001. ISSN 0012-1606. <https://doi.org/10.1006/dbio.2000.9947>

DE SOUSA, P. A. et al. Temporal patterns of embryonic gene expression and their dependence on oogenetic factors. **Theriogenology**, v. 49, n. 1, p. 115-128, Jan 01 1998. ISSN 0093-691X. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00406-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00406-8)

DENOMME, M. M.; MANN, M. R. Maternal control of genomic imprint maintenance. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 27, n. 6, p. 629-636, 2013. ISSN 1472-6483. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2013.06.004>

DEPLUS, R. et al. Dnmt3L is a transcriptional repressor that recruits histone deacetylase. **Nucleic Acids Research**, v. 30, n. 17, p. 3831-3838, 2002. ISSN 1362-4962. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf509>

DESCHAMPS, J. C. et al. PRODUÇÃO IN VITRO DE EMBRIÕES SUINOS. **Current Agricultural Science and Technology**, v. 13, n. 3, 2007. ISSN 2317-2436.

DONOHUE, M. E. et al. The pluripotency factor Oct4 interacts with Ctf and also controls X-chromosome pairing and counting. **Nature**, v. 460, n. 7251, p. 128, 2009. ISSN 1476-4687. <https://doi.org/10.1038/nature08098>

DUPONT, C.; ARMANT, D. R.; BRENNER, C. A. Epigenetics: definition, mechanisms and clinical perspective. **Seminars in Reproductive Medicine**, 2009, NIH Public Access. p.351.

EGGENSCHWILER, J. et al. Mouse mutant embryos overexpressing IGF-II exhibit phenotypic features of the Beckwith–Wiedemann and Simpson–Golabi–Behmel syndromes. **Genes & Development**, v. 11, n. 23, p. 3128-3142, 1997. ISSN 0890-9369. <https://doi.org/10.1101/gad.11.23.3128>

ESTELLER, M. Epigenetics in cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 358, n. 11, p. 1148-1159, 2008. <https://doi.org/10.1056/NEJMra072067>

FAGUNDES, D. J.; TAHA, M. O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirurgica Brasileira**, v. 19, n. 1, p. 59-65, 2004. ISSN 0102-8650. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502004000100010>

FAGUNDES, N. et al. Methylation status in the intragenic differentially methylated region of the IGF2 locus in Bos taurus indicus oocytes with different developmental competencies. **Molecular Human Reproduction**, v. 17, n. 2, p. 85-91, 2011. ISSN 1360-9947. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaq075>

FAIR, T. Follicular oocyte growth and acquisition of developmental competence. **Animal Reproduction Science**, v. 78, n. 3-4, p. 203-216, 2003. ISSN 0378-4320. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(03\)00091-5](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(03)00091-5)

FAULK, C.; DOLINOY, D. C. Timing is everything: the when and how of environmentally induced changes in the epigenome of animals. **Epigenetics**, v. 6, n. 7, p. 791-797, 2011. ISSN 1559-2294. <https://doi.org/10.4161/epi.6.7.16209>

FERREIRA, A.; FRANCO, M. Inativação do cromossomo X em mamíferos. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, p. 341-346, 2011.

FERREIRA, E. et al. Cytoplasmic maturation of bovine oocytes: structural and biochemical modifications and acquisition of developmental competence. **Theriogenology**, v. 71, n. 5, p. 836-848, 2009. ISSN 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2008.10.023>

FESSELE, K. L.; WRIGHT, F. Primer in Genetics and Genomics, Article 6: Basics of Epigenetic Control. **Biological Research for Nursing**, p. 1099800417742967, 2017. ISSN 1099-8004.

FINGERMAN, I. M. et al. NCBI Epigenomics: what's new for 2013. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. D1, p. D221-D225, 2012. ISSN 0305-1048. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1171>

FORTUNE, J. et al. The primordial to primary follicle transition. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 163, n. 1-2, p. 53-60, 2000. ISSN 0303-7207. [https://doi.org/10.1016/S0303-7207\(99\)00240-3](https://doi.org/10.1016/S0303-7207(99)00240-3)

FRANCO, M. M. et al. Characterisation of the methylation pattern in the intragenic CpG island of the IGF2 gene in Bos taurus indicus cumulus cells during in vitro maturation. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 31, n. 1, p. 115-120, 2014. ISSN 1058-0468. <https://doi.org/10.1007/s10815-013-0106-y>

FRANCO, M. M.; MARINHO, L. S. R.; LUNARDELLI, P. A. EPIGENETIC MODIFICATIONS AND THEIR ROLES IN ANIMAL REPRODUCTION. **Biotechnology of animal reproduction/editors, Marcelo Marcondes**, p. 315, 2016.

FRANCO, M. M.; PRICKETT, A. R.; OAKEY, R. J. The role of CCCTC-binding factor (CTCF) in genomic imprinting, development, and reproduction. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 5, 2014. ISSN 0006-3363. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.114.122945>

FRARE, A. et al. **Ciclo Estral em Suínos**. Faculdade Assis Gurgacz, Cascavél, 2013. Disponível em: <https://www.academia.edu/8068571/CICLO_ESTRAL_EM_SUINOS>. p. 9, 2013.

FROST, J. M.; MOORE, G. E. The importance of imprinting in the human placenta. **PLoS Genetics**, v. 6, n. 7, p. e1001015, 2010. ISSN 1553-7404. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001015>

GEBERT, C. et al. H19ICR mediated transcriptional silencing does not require target promoter methylation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 476, n. 3, p. 121-126, 2016. ISSN 0006-291X. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.05.042>

GEBERT, C. et al. The bovine IGF2 gene is differentially methylated in oocyte and sperm DNA. **Genomics**, v. 88, n. 2, p. 222-229, 2006. ISSN 0888-7543. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2006.03.011>

GILCHRIST, R. B.; LANE, M.; THOMPSON, J. G. Oocyte-secreted factors: regulators of cumulus cell function and oocyte quality. **Human Reproduction Update**, v. 14, n. 2, p. 159-177, 2008. ISSN 1460-2369. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmm040>

GILCHRIST, R. B.; THOMPSON, J. G. Oocyte maturation: emerging concepts and technologies to improve developmental potential in vitro. **Theriogenology**, v. 67, n. 1, p. 6-15, 2007. ISSN 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2006.09.027>

GOLL, M. G. et al. Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. **Science**, v. 311, n. 5759, p. 395-398, 2006. ISSN 0036-8075. <https://doi.org/10.1126/science.1120976>

GOMES, L. F. S. Padrão de metilação dos genes IGF2 e XIST em ovócitos oriundos de folículos pré-antrais de vacas Nelore (*Bos taurus indicus*). **Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia**, p. 62, 2011.

GOTTARDI, F.; MINGOTI, G. Maturação de oócitos bovinos e influência na aquisição da competência para o desenvolvimento do embrião. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 33, n. 2, p. 82 - 94, 2009.

GREGG, C. The emerging landscape of in vitro and in vivo epigenetic allelic effects. **F1000Research**, v. 6, 2017.

GRUPEN, C. G. The evolution of porcine embryo in vitro production. **Theriogenology**, v. 81, n. 1, p. 24-37, 2014. ISSN 0093-691X. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2013.09.022>

GRUPEN, C. G. et al. Relationship between donor animal age, follicular fluid steroid content and oocyte developmental competence in the pig. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 15, n. 2, p. 81-87, 2003. ISSN 1448-5990. <https://doi.org/10.1071/RD02086>

HAJKOVA, P. et al. Chromatin dynamics during epigenetic reprogramming in the mouse germ line. **Nature**, v. 452, n. 7189, p. 877-881, 2008. ISSN 0028-0836. <https://doi.org/10.1038/nature06714>

HAN, D. W. et al. Methylation status of putative differentially methylated regions of porcine IGF2 and H19. **Molecular Reproduction and Development**, v. 75, n. 5, p. 777-784, 2008. ISSN 1098-2795. <https://doi.org/10.1002/mrd.20802>

HILL, P. W.; AMOUROUX, R.; HAJKOVA, P. DNA demethylation, Tet proteins and 5-hydroxymethylcytosine in epigenetic reprogramming: an emerging complex story. **Genomics**, v. 104, n. 5, p. 324-333, 2014. ISSN 0888-7543. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2014.08.012>

HOKI, Y. et al. A proximal conserved repeat in the Xist gene is essential as a genomic element for X-inactivation in mouse. **Development**, v. 136, n. 1, p. 139-146, 2009. ISSN 0950-1991. <https://doi.org/10.1242/dev.026427>

HUAN, Y. et al. A novel role for DNA methyltransferase 1 in regulating oocyte cytoplasmic maturation in pigs. **PloS One**, v. 10, n. 5, p. e0127512, 2015. ISSN 1932-6203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127512>

HUYNH, K. D.; LEE, J. T. Inheritance of a pre-inactivated paternal X chromosome in early mouse embryos. **Nature**, v. 426, n. 6968, p. 857, 2003. ISSN 1476-4687. <https://doi.org/10.1038/nature02222>

HWANG, J. Y. et al. Identification of the porcine XIST gene and its differential CpG methylation status in male and female pig cells. **PloS One**, v. 8, n. 9, p. e73677, 2013. ISSN 1932-6203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073677>

HWANG, J. Y. et al. Dosage compensation of X-chromosome inactivation center-linked genes in porcine preimplantation embryos: Non-chromosome-wide initiation of X-chromosome inactivation in blastocysts. **Mechanisms of Development**, v. 138, p. 246-255, 2015. ISSN 0925-4773. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2015.10.005>

HYLDIG, S. M. et al. Epigenetic reprogramming in the porcine germ line. **BMC Developmental Biology**, v. 11, n. 1, p. 11, 2011. ISSN 1471-213X. <https://doi.org/10.1186/1471-213X-11-11>

IACOBUZIO-DONAHUE, C. A. Epigenetic changes in cancer. **Annual Review of Pathological Mechanical Disease**, v. 4, p. 229-249, 2009. ISSN 1553-4006. <https://doi.org/10.1146/annurev.pathol.3.121806.151442>

IDERAABDULLAH, F. Y.; VIGNEAU, S.; BARTOLOMEI, M. S. Genomic imprinting mechanisms in mammals. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 647, n. 1, p. 77-85, 2008. ISSN 0027-5107. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2008.08.008>

INOUE, A. et al. Genomic imprinting of Xist by maternal H3K27me3. **Genes & Development**, v. 31, n. 19, p. 1927-1932, 2017. ISSN 0890-9369. <https://doi.org/10.1101/gad.304113.117>

IURLARO, M. et al. In vivo genome-wide profiling reveals a tissue-specific role for 5-formylcytosine. **Genome Biology**, v. 17, n. 1, p. 141, 2016. ISSN 1474-760X. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1001-5>

JAENISCH, R. DNA methylation and imprinting: why bother? **Trends in Genetics**, v. 13, n. 8, p. 323-329, 1997. ISSN 0168-9525. [https://doi.org/10.1016/S0168-9525\(97\)01180-3](https://doi.org/10.1016/S0168-9525(97)01180-3)

JELTSCH, A. et al. Mechanism and biological role of Dnmt2 in nucleic acid methylation. **RNA Biology**, v. 14, n. 9, p. 1108-1123, 2017. ISSN 1547-6286. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1191737>

JEON, Y.; SARMA, K.; LEE, J. T. New and Xisting regulatory mechanisms of X chromosome inactivation. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 22, n. 2, p. 62-71, 2012. ISSN 0959-437X. <https://doi.org/10.1016/j.gde.2012.02.007>

JOHN, R. M.; SURANI, M. A. Imprinted genes and regulation of gene expression by epigenetic inheritance. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 8, n. 3, p. 348-353, 1996. ISSN 0955-0674. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(96\)80008-1](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(96)80008-1)

JURKOWSKA, R. Z.; JURKOWSKI, T. P.; JELTSCH, A. Structure and function of mammalian DNA methyltransferases. **Chembiochem**, v. 12, n. 2, p. 206-222, 2011. ISSN 1439-7633. <https://doi.org/10.1002/cbic.201000195>

KANG, J.; KALANTRY, S.; RAO, A. PGC7, H3K9me2 and Tet3: regulators of DNA methylation in zygotes. **Cell Research**, v. 23, n. 1, p. 6-9, 2013. ISSN 1001-0602. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.117>

KELLERMANN, N. P. Epigenetic transmission of holocaust trauma: can nightmares be inherited? **The Israel Journal of Psychiatry and Related Sciences**, v. 50, n. 1, p. 33, 2013. ISSN 0333-7308.

KIKUCHI, K. Developmental competence of porcine blastocysts produced in vitro. **Journal of Reproduction and Development**, v. 50, n. 1, p. 21-28, 2004. ISSN 0916-8818. <https://doi.org/10.1262/jrd.50.21>

KIKUCHI, K. et al. Successful piglet production after transfer of blastocysts produced by a modified in vitro system. **Biology of Reproduction**, v. 66, n. 4, p. 1033-1041, 2002. ISSN 0006-3363. <https://doi.org/10.1095/biolreprod66.4.1033>

KOHLI, R. M.; ZHANG, Y. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. **Nature**, v. 502, n. 7472, p. 472-479, 2013. ISSN 0028-0836. <https://doi.org/10.1038/nature12750>

KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, v. 128, n. 4, p. 693-705, 2007. ISSN 0092-8674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>

KRAGH, P. M. et al. Hemizygous minipigs produced by random gene insertion and handmade cloning express the Alzheimer's disease-causing dominant mutation APPsw. **Transgenic Research**, v. 18, n. 4, p. 545-558, 2009. ISSN 0962-8819. <https://doi.org/10.1007/s11248-009-9245-4>

KUBELKA, M. et al. Time sequence of germinal vesicle breakdown in pig oocytes after cycloheximide and P-aminobenzamidine block. **Molecular Reproduction and Development**, v. 19, n. 4, p. 423-31, Apr 1988. ISSN 0148-7280. <https://doi.org/10.1002/mrd.1120190414>

KUMAKI, Y.; ODA, M.; OKANO, M. QUMA: quantification tool for methylation analysis. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. suppl_2, p. W170-W175, 2008. ISSN 0305-1048.

LAU, M. et al. Loss of the imprinted IGF2/cation-independent mannose 6-phosphate receptor results in fetal overgrowth and perinatal lethality. **Genes & Development**, v. 8, n. 24, p. 2953-2963, 1994. ISSN 0890-9369. <https://doi.org/10.1101/gad.8.24.2953>

LEE, J. et al. Colcemid treatment during oocyte maturation improves preimplantation development of cloned pig embryos by influencing meiotic progression and cytoplasmic maturation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 82, n. 6, p. 489-97, Jun 2015. ISSN 1040-452x. <https://doi.org/10.1002/mrd.22498>

LEE, J. T. Gracefully ageing at 50, X-chromosome inactivation becomes a paradigm for RNA and chromatin control. **Nature Reviews Molecular cell Biology**, v. 12, n. 12, p. 815, 2011. ISSN 1471-0080. <https://doi.org/10.1038/nrm3231>

LEROY, J. L. et al. Nutrition and maternal metabolic health in relation to oocyte and embryo quality: critical views on what we learned from the dairy cow model. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 27, n. 4, p. 693-703, 2015. ISSN 1448-5990. <https://doi.org/10.1071/RD14363>

LEWIS, A.; REIK, W. How imprinting centres work. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 113, n. 1-4, p. 81-89, 2006. ISSN 1424-8581. <https://doi.org/10.1159/000090818>

LI, E.; BEARD, C.; JAENISCH, R. Role for DNA methylation in genomic imprinting. **Nature**, v. 366, n. 6453, p. 362, 1993. ISSN 1476-4687. <https://doi.org/10.1038/366362a0>

LI, T. et al. IVF results in de novo DNA methylation and histone methylation at an Igf2-H19 imprinting epigenetic switch. **Molecular Human Reproduction**, v. 11, n. 9, p. 631-640, 2005. ISSN 1460-2407.

LIANG, Y. et al. DNA methylation pattern in mouse oocytes and their in vitro fertilized early embryos: effect of oocyte vitrification. **Zygote**, v. 22, n. 2, p. 138-145, 2014. ISSN 0967-1994.

LIU, H. et al. The Effects of Polyadenylation Status on MPFs During In Vitro Porcine Oocyte Maturation. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 39, n. 5, p. 1735-1745, 2016. ISSN 1015-8987. <https://doi.org/10.1159/000447874>

LONERGAN, P. et al. Bovine oocyte and embryo development following meiotic inhibition with butyrolactone I. **Molecular Reproduction and Development**, v. 57, n. 2, p. 204-9, Oct 2000. ISSN 1040-452X. [https://doi.org/10.1002/1098-2795\(200010\)57:2<204::AID-MRD12>3.0.CO;2-N](https://doi.org/10.1002/1098-2795(200010)57:2<204::AID-MRD12>3.0.CO;2-N)

LUGER, K. et al. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. **Nature**, v. 389, n. 6648, p. 251-260, 1997. ISSN 0028-0836. <https://doi.org/10.1038/38444>

LUNNEY, J. K. Advances in Swine Biomedical Model Genomics. **International Journal of Biological Sciences**, v. 3, n. 3, p. 179-84, 2007. <https://doi.org/10.7150/ijbs.3.179>

LUO, Y. et al. High efficiency of BRCA1 knockout using rAAV-mediated gene targeting: developing a pig model for breast cancer. **Transgenic Research**, v. 20, n. 5, p. 975-988, 2011. ISSN 0962-8819. <https://doi.org/10.1007/s11248-010-9472-8>

LUO, Y. et al. Genetically modified pigs for biomedical research. **Journal of Inherited Metabolic Disease**, v. 35, n. 4, p. 695-713, 2012. ISSN 0141-8955. <https://doi.org/10.1007/s10545-012-9475-0>

LYON, M. F. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). **Nature**, v. 190, n. 4773, p. 372-373, 1961. ISSN 0028-0836. <https://doi.org/10.1038/190372a0>

MACAULAY, A. D. et al. The gametic synapse: RNA transfer to the bovine oocyte. **Biology of Reproduction**, v. 91, n. 4, p. 90, 1-12, 2014. ISSN 0006-3363.

MACDONALD, W. A.; MANN, M. R. Epigenetic regulation of genomic imprinting from germ line to preimplantation. **Molecular Reproduction and Development**, v. 81, n. 2, p. 126-140, 2014. ISSN 1098-2795. <https://doi.org/10.1002/mrd.22220>

MAMO, S. et al. Sequential analysis of global gene expression profiles in immature and in vitro matured bovine oocytes: potential molecular markers of oocyte maturation. **BMC Genomics**, v. 12, n. 1, p. 151, 2011. ISSN 1471-2164. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-151>

MARCHAL, R. et al. Meiotic and developmental competence of prepubertal and adult swine oocytes. **Theriogenology**, v. 56, n. 1, p. 17-29, Jul 01 2001. ISSN 0093-691X. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(01\)00539-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(01)00539-8)

MARCHAL, R. et al. Effect of follicular size on meiotic and developmental competence of porcine oocytes. **Theriogenology**, v. 57, n. 5, p. 1523-1532, 2002. ISSN 0093-691X. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(02\)00655-6](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(02)00655-6)

MARQUES, M. G. et al. In vitro maturation of pig oocytes with different media, hormone and meiosis inhibitors. **Animal Reproduction Science**, v. 97, n. 3, p. 375-381, 2007. ISSN 0378-4320. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2006.02.013>

MATTIOLI, M. et al. Developmental competence of pig oocytes matured and fertilized in vitro. **Theriogenology**, v. 31, n. 6, p. 1201-1207, 1989. ISSN 0093-691X. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(89\)90089-7](https://doi.org/10.1016/0093-691X(89)90089-7)

MEHLMANN, L. M. Stops and starts in mammalian oocytes: recent advances in understanding the regulation of meiotic arrest and oocyte maturation. **Reproduction**, v. 130, n. 6, p. 791-799, 2005. ISSN 1470-1626. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00793>

MENDONÇA, A. D. S. Caracterização epigenética e funcional do Transcrito Específico do X Inativo (XIST) durante o desenvolvimento embrionário inicial in vitro em bovinos. **Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia**, p. 159, 2017.

MENDONÇA, A. D. S. et al. Characterization of the IGF2 imprinted gene methylation status in bovine oocytes during folliculogenesis. **PloS One**, v. 10, n. 10, p. e0142072, 2015. ISSN 1932-6203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142072>

MIELE, V. et al. DNA physical properties determine nucleosome occupancy from yeast to fly. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 11, p. 3746-3756, 2008. ISSN 1362-4962. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn262>

MOHANDAS, T.; SPARKES, R.; SHAPIRO, L. Reactivation of an inactive human X chromosome: evidence for X inactivation by DNA methylation. **Science**, v. 211, n. 4480, p. 393-396, 1981. ISSN 0036-8075. <https://doi.org/10.1126/science.6164095>

MORGAN, H. D. et al. Epigenetic reprogramming in mammals. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. suppl_1, p. R47-R58, 2005. ISSN 1460-2083.

MURRELL, A.; HEESON, S.; REIK, W. Interaction between differentially methylated regions partitions the imprinted genes Igf2 and H19 into parent-specific chromatin loops. **Nature Genetics**, v. 36, n. 8, p. 889, 2004. ISSN 1546-1718. <https://doi.org/10.1038/ng1402>

NAKAMURA, Y.; TAJIMA, S.; KIKUCHI, K. The quality after culture in vitro or in vivo of porcine oocytes matured and fertilized in vitro and their ability to develop to term. **Animal Science Journal**, 2017. ISSN 1740-0929. <https://doi.org/10.1111/asj.12855>

NAMEKAWA, S. H. et al. Postmeiotic sex chromatin in the male germline of mice. **Current Biology**, v. 16, n. 7, p. 660-667, 2006. ISSN 0960-9822. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.01.066>

NAVARRO, P. et al. Molecular coupling of Xist regulation and pluripotency. **Science**, v. 321, n. 5896, p. 1693-1695, 2008. ISSN 0036-8075. <https://doi.org/10.1126/science.1160952>

NICIURA, S. C. M.; SARAIVA, N. Z. **Epigenética: bases moleculares, efeitos na fisiologia e na patologia, e implicações para a produção animal e a vegetal**. Embrapa, 2014. ISBN 857035357X.

O'BRIEN, J. et al. Comparison of in vitro maturation, in vitro fertilization, metabolism and ultrastructure of oocytes from prepubertal and adult pigs. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 35, n. 3-4, p. 101-107, 2000. ISSN 1439-0531. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0531.2000.00206.x>

O'DELL, S. D.; DAY, I. N. Molecules in focus Insulin-like growth factor II (IGF-II). **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 30, n. 7, p. 767-771, 1998. ISSN 1357-2725. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(98\)00048-X](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(98)00048-X)

PACZKOWSKI, M. et al. Alterations in the transcriptome of porcine oocytes derived from prepubertal and cyclic females is associated with developmental potential. **Journal of Animal**

Science, v. 89, n. 11, p. 3561-3571, 2011. ISSN 1525-3163. <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4193>

PARK, C.-H. et al. Methylation status of differentially methylated regions at Igf2/H19 locus in porcine gametes and preimplantation embryos. **Genomics**, v. 93, n. 2, p. 179-186, 2009. ISSN 0888-7543. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2008.10.002>

PARK, C.-H. et al. Analysis of imprinted gene expression in normal fertilized and uniparental preimplantation porcine embryos. **PloS One**, v. 6, n. 7, p. e22216, 2011. ISSN 1932-6203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022216>

PETKOV, S. G.; REH, W. A.; ANDERSON, G. B. Methylation changes in porcine primordial germ cells. **Molecular Reproduction and Development**, v. 76, n. 1, p. 22-30, 2009. ISSN 1098-2795. <https://doi.org/10.1002/mrd.20926>

PLATH, K. et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. **Science**, v. 300, n. 5616, p. 131-135, 2003. ISSN 0036-8075. <https://doi.org/10.1126/science.1084274>

PRATHER, R.; DAY, B. Practical considerations for the in vitro production of pig embryos. **Theriogenology**, v. 49, n. 1, p. 23-32, 1998. ISSN 0093-691X. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(97\)00399-3](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(97)00399-3)

REIK, W.; DEAN, W.; WALTER, J. Epigenetic reprogramming in mammalian development. **Science**, v. 293, n. 5532, p. 1089-1093, 2001. ISSN 0036-8075. <https://doi.org/10.1126/science.1063443>

RUAN, D. et al. XIST Derepression in Active X Chromosome Hinders Pig Somatic Cell Nuclear Transfer. **Stem Cell Reports**, 2018. ISSN 2213-6711. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2017.12.015>

RUSSELL, L. B. Mammalian X-chromosome action: inactivation limited in spread and in region of origin. **Science**, v. 140, n. 3570, p. 976-978, 1963. ISSN 0036-8075. <https://doi.org/10.1126/science.140.3570.976>

SADO, T.; HOKI, Y.; SASAKI, H. Tsix silences Xist through modification of chromatin structure. **Developmental Cell**, v. 9, n. 1, p. 159-165, 2005. ISSN 1534-5807. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2005.05.015>

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 2001: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 2001.

SEISENBERGER, S. et al. Reprogramming DNA methylation in the mammalian life cycle: building and breaking epigenetic barriers. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London B**, v. 368, n. 1609, p. 20110330, 2013. ISSN 0962-8436. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0330>

SERRET, C. G. et al. Produção "in vitro" de embriões suínos. **Revista Brasileira de Agrociencia**, v. 13, n. 3, p. 285-289, 2007. ISSN 0104-8996.

SERRER, E. S.; RATHBUN, T. J.; DAVIS, D. L. Fertilization and blastocyst development in oocytes obtained from prepubertal and adult pigs¹. **Journal of Animal Science**, v. 82, n. 1, 2004. Disponível em: < <http://dx.doi.org/2004.821102x> >.

SHIRANE, K. et al. Mouse oocyte methylomes at base resolution reveal genome-wide accumulation of non-CpG methylation and role of DNA methyltransferases. **PLoS Genetics**, v. 9, n. 4, p. e1003439, 2013. ISSN 1553-7404. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003439>

SMOLLE, M.; WORKMAN, J. L. Transcription-associated histone modifications and cryptic transcription. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1829, n. 1, p. 84-97, 2013. ISSN 1874-9399.

SOEDE, N.; KEMP, B. Expression of oestrus and timing of ovulation in pigs. **Journal of Reproduction and Fertility. Supplement**, v. 52, p. 91-103, 1997. ISSN 0449-3087.

SOMFAI, T. et al. Live piglets derived from in vitro-produced zygotes vitrified at the pronuclear stage. **Biology of Reproduction**, v. 80, n. 1, p. 42-49, 2009. ISSN 0006-3363. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.108.070235>

SOTO-SUAZO, M.; ZORN, T. Primordial germ cells migration: morphological and molecular aspects. **Animal Reproduction**, v. 2, n. 3, p. 147-160, 2005.

SPRÍCIGO, J. et al. Vitrification of bovine oocytes at different meiotic stages using the Cryotop method: assessment of morphological, molecular and functional patterns. **Cryobiology**, v. 69, n. 2, p. 256-265, 2014. ISSN 0011-2240. <https://doi.org/10.1016/j.cryobiol.2014.07.015>

STEWART, K. R.; VESELOVSKA, L.; KELSEY, G. Establishment and functions of DNA methylation in the germline. **Epigenomics**, v. 8, n. 10, p. 1399-1413, 2016. ISSN 1750-1911. <https://doi.org/10.2217/epi-2016-0056>

SUN, B. K.; DEATON, A. M.; LEE, J. T. A transient heterochromatic state in Xist preempts X inactivation choice without RNA stabilization. **Molecular Cell**, v. 21, n. 5, p. 617-628, 2006. ISSN 1097-2765. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2006.01.028>

SUTTIROJPATTANA, T. et al. Effect of storage tube material and resveratrol during liquid storage of matured bovine oocytes on subsequent development. **Acta Veterinaria Hungarica**, v. 65, n. 4, p. 546-555, 2017. ISSN 0236-6290. <https://doi.org/10.1556/004.2017.053>

SWAIN, J. et al. Use of energy substrates by various stage preimplantation pig embryos produced in vivo and in vitro. **Reproduction**, v. 123, n. 2, p. 253-260, 2002. ISSN 1470-1626. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1230253>

TAKAGI, N.; SASAKI, M. Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse. **Nature**, v. 256, n. 5519, p. 640, 1975. ISSN 1476-4687. <https://doi.org/10.1038/256640a0>

TELFORD, N. A.; WATSON, A. J.; SCHULTZ, G. A. Transition from maternal to embryonic control in early mammalian development: a comparison of several species. **Molecular Reproduction and Development**, v. 26, n. 1, p. 90-100, May 1990. ISSN 1040-452X. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080260113>

TSOULIS, M. W. et al. Maternal high-fat diet-induced loss of fetal oocytes is associated with compromised follicle growth in adult rat offspring. **Biology of Reproduction**, v. 94, n. 4, 2016. ISSN 0006-3363. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.115.135004>

VAN DE LEEMPUT, E. E. et al. Improved in vitro embryo development using in vivo matured oocytes from heifers superovulated with a controlled preovulatory LH surge. **Theriogenology**, v. 52, n. 2, p. 335-49, Jul 15 1999. ISSN 0093-691X. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00133-8](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00133-8)

- VAN DIJK, S. et al. Epigenetics and human obesity. **International Journal of Obesity**, v. 39, n. 1, p. 85-97, 2015. ISSN 0307-0565. <https://doi.org/10.1038/ijo.2014.34>
- WANG, Q.; SUN, Q.-Y. Evaluation of oocyte quality: morphological, cellular and molecular predictors. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 19, n. 1, p. 1-12, 2006. ISSN 1448-5990. <https://doi.org/10.1071/RD06103>
- WATSON, A. J. Oocyte cytoplasmic maturation: a key mediator of oocyte and embryo developmental competence. **Journal of Animal Science**, v. 85, n. 13 Suppl, p. E1-3, Mar 2007. ISSN 0021-8812. <https://doi.org/10.2527/jas.2006-432>
- WIJCHERS, P. J.; FESTENSTEIN, R. J. Epigenetic regulation of autosomal gene expression by sex chromosomes. **Trends in Genetics**, v. 27, n. 4, p. 132-140, 2011. ISSN 0168-9525. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2011.01.004>
- WU, B. et al. Temporal distinctions in the synthesis and accumulation of proteins by oocytes and cumulus cells during maturation in vitro of bovine oocytes. **Molecular Reproduction and Development**, v. 45, n. 4, p. 560-565, Dec 1996. ISSN 1040-452X. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(199612\)45:4<560::AID-MRD18>3.0.CO;2-#](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(199612)45:4<560::AID-MRD18>3.0.CO;2-#)
- XU, J.; ANDREASSI, M. Reversible histone methylation regulates brain gene expression and behavior. **Hormones and Behavior**, v. 59, n. 3, p. 383-392, 2011. ISSN 0018-506X. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.08.019>
- XU, N. et al. Evidence that homologous X-chromosome pairing requires transcription and Ctf protein. **Nature Genetics**, v. 39, n. 11, p. 1390, 2007. ISSN 1546-1718. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.5>
- YANG, Y. et al. Mutation of the XIST gene upregulates expression of X-linked genes but decreases the developmental rates of cloned male porcine embryos. **Molecular Reproduction and Development**, v. 84, n. 6, p. 525-534, 2017. ISSN 1098-2795. <https://doi.org/10.1002/mrd.22808>
- YOON, K.-W. et al. Development of porcine oocytes from preovulatory follicles of different sizes after maturation in media supplemented with follicular fluids. **Reproduction, Fertility and Development**, v. 12, n. 4, p. 133-139, 2000. ISSN 1448-5990. <https://doi.org/10.1071/RD00027>
- YOSHIDA, M. et al. Birth of piglets derived from in vitro fertilization of pig oocytes matured in vitro. **Theriogenology**, v. 39, n. 6, p. 1303-1311, 1993. ISSN 0093-691X. [https://doi.org/10.1016/0093-691X\(93\)90232-T](https://doi.org/10.1016/0093-691X(93)90232-T)
- YOUNG, L.; FAIRBURN, H. Improving the safety of embryo technologies: possible role of genomic imprinting. **Theriogenology**, v. 53, n. 2, p. 627-648, 2000. ISSN 0093-691X. [https://doi.org/10.1016/S0093-691X\(99\)00263-0](https://doi.org/10.1016/S0093-691X(99)00263-0)
- YUAN, L. et al. Aberrant expression of Xist in aborted porcine fetuses derived from somatic cell nuclear transfer embryos. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 15, n. 12, p. 21631-21643, 2014. <https://doi.org/10.3390/ijms151221631>
- ZHAO, J. et al. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. **Science**, v. 322, n. 5902, p. 750-756, 2008. ISSN 0036-8075. <https://doi.org/10.1126/science.1163045>

ZINOVIEVA, N. et al. Application of GAL-KO transgenic pigs in xenotransplantation: problems and prospects for the future. **Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]**, v. 2, p. 42-49, 2014.

ZUCCOTTI, M. et al. What does it take to make a developmentally competent mammalian egg? **Human Reproduction Update**, v. 17, n. 4, p. 525-540, 2011. ISSN 1460-2369. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmr009>

ZUCCOTTI, M.; MONK, M. Methylation of the mouse Xist gene in sperm and eggs correlates with imprinted Xist expression and paternal X-inactivation. **Nature Genetics**, v. 9, n. 3, p. 316, 1995. ISSN 1546-1718. <https://doi.org/10.1038/ng0395-316>